Ministère de l'Agriculture

Institut National de la Recherche Agronomique

P. 4228

COMPTES RENDUS ANNUELS DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

Vol. 14

1985

C. N. R. A.
22 MAI 1986
UNITÉ CENTRALE DE DOCUMENTATION
— VERSAILLES —

INRA

Centre de Recherches d'AVIGNON

Domaine St Paul, 84140 Montfavet

(France)

Titre abrégé pour les citations : *C. R. Ann. Trav. Lab. Biochimie, 1979, 8.*

LB-14

Sommaire

Première Partie

COMPTE-RENDU SCIENTIFIQUE

I - BIOCHIMIE GENERALE ET COMPAREE

1 - Action comparée de l'injection des formes cyclique et linéaire de la somatostatine sur la lipémie de l'Abeille in vivo.

2 - Effets adrénergiques agonistes et antagonistes sur la lipémie de l'Abeille

3 - Action de l'insuline endogène d'abeille sur les relations glucido-lipidiques dans l'hémolymphe d'abeilles et interaction de la somatostatine

4 - Analogie d'action de deux effecteurs hyperglycémiants : l'AMPc et le glucagon injectés chez l'abeille in vivo

5 - Comparaison des classes de lipides de l'hémolymphe à divers stades du développement chez l'Abeille

6 - Héritabilité de la glycémie de l'Abeille : difficultés d'étude liées à des facteurs extérieurs.

7 - Projets de Recherches

II - BIOCHIMIE THANATOLOGIQUE ET CRYPTO-TOXICOLOGIQUE

1 - Action de la deltaméthrine à dose sublétale sur la glycémie, l'amino-acidémie, et les phosphatases intestinales de l'Abeille.

2 - Perturbations des relations glucido-lipidiques provoquées par le jeûne chez l'Abeille

3 - Etude des mécanismes biochimiques d'action de la toxine du Bacillus thuringiensis (var. israelensis) chez Aedes aegypti

4 - Recherches sur un palliatif hormonal des traumatismes biochimiques provoqués par l'isolement chez l'Abeille

5 - Projets de Recherches

III - BIOCHIMIE PHYTO-SEMIOLOGIQUE

1 - Mécanismes moléculaires associés à la résistance d'une plante-hôte à un pathogène

2 - Mécanismes moléculaires liés à la résistance du Pin sylvestre aux scolytes et aux pathogènes fongiques transmis par l'insecte

3 - Traumatologie biochimique végétale

4 - Développements techniques

5 - Projets de Recherches

IV - LISTE DES PUBLICATIONS

V - ACTIVITES ANNEXES

1 - Recherche bibliographique

2 - Relations Internationales et demandes sabbatiques

3 - Dossier informatique

4 - Enseignement

5 - Interventions publiques radiodiffusées

6 - Conseil scientifique du P.N.R.L.

7 - Expertises scientifiques ("Referee")

Deuxième partie

COMPTE RENDU ADMINISTRATIF

I - Bilan budgétaire 1985

II - Perspectives et prévisions 1986

CONCLUSION

La création d'idées neuves est l'acte
le plus précieux de l'intelligence ...
(Vendryès 1981 - L'autonomie du Vivant,
Maloine, p. 80)

Première Partie

COMPTE RENDU SCIENTIFIQUE

Les programmes du laboratoire restent orientés, conformément aux objectifs prioritaires fixés par l'INRA au Département de Phytopharmacie et d'Ecotoxicologie, vers l'étude des mécanismes moléculaires impliqués d'une part dans les effets non intentionnels des pesticides sur l'Abeille et d'autre part dans les processus de résistance des Végétaux aux parasites et aux pathogènes. Ces recherches doivent s'appuyer obligatoirement sur une connaissance suffisante des mécanismes biochimiques susceptibles de constituer des "cibles", étant entendu qu'une cible ne saurait être reconnue comme telle qu'a posteriori. Une préparation fondamentale reste, donc, indispensable et, en fonction des impératifs inhérents aux sources de financement, il peut arriver que ce genre d'approche soit opéré de manière indirecte, par exemple : l'effet de groupe, chez l'Abeille, ou encore les travaux de toxicologie biochimique chez Aedes : il s'agit dans chaque cas de recherches axées sur une **traumatologie biochimique comparée**, dont les résultats seront d'un intérêt tangible lors de la transposition aux programmes toxicologiques sur l'Abeille.

... La vie animale consiste 1°
à se procurer une provision d'énergie,
2° à la dépenser ...,
Bergson 1941, L'évolution Créatrice,
P.U.F., p. 253

I - BIOCHIMIE GENERALE ET COMPAREE

Les travaux de 1985 ont été axés principalement sur l'étude des relations glucido-lipidiques, et sur le contrôle hormonal de la lipémie, chez l'abeille. Les résultats ont valu à leur auteur la remise du Prix Foulon de l'Académie des Sciences lors de la séance solennelle du 2 décembre, à Paris.

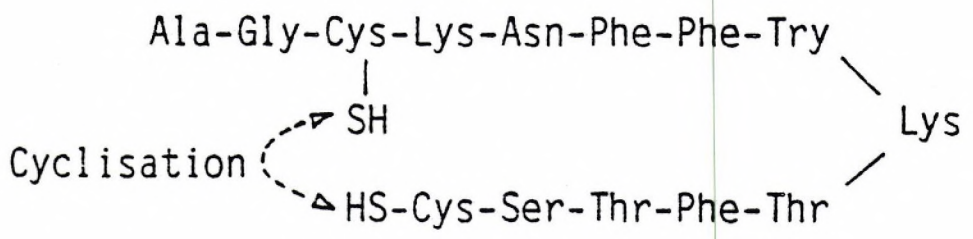
Les recherches ont fait apparaître les analogies (et quelques nuances) d'action sur la lipémie des deux formes de la somatostatine. L'étude des effets aminergiques sur la lipémie s'est révélée d'une certaine complexité, mais des analogies avec les Vertébrés ont été, de nouveau, mises en évidence. L'action de l'insuline endogène d'abeille a été analysée à partir des extraits isolés et purifiés par les Drs. R. MOREAU et L. GOURDOUX, de l'Université de Bordeaux I, avec lesquels la collaboration établie depuis plusieurs années va être appelée à s'intensifier.

L'étude du mode d'action du glucagon a montré de grandes analogies avec celui de l'AMPc. Un équivalent du glucagon a été identifié par le Prof. Dr. MAIER dans diverses parties du corps de l'Abeille, et sa purification est en cours. Une collaboration avec l'Université de ULM est en train de se mettre en place sur ce programme.

1 - Action comparée de l'injection des formes cyclique et linéaire de la somatostatine de Vertébrés sur la lipémie de l'Apeille in vivo (M. BOUNIAS)

Introduction

Peu après l'isolement et la purification de la somatostatine (SRIF) réalisés en 1972 à partir de l'hypothalamus de vertébrés [1] sa formule brute était établie [2]. La détermination de la séquence des 14 amino-acides qui la constituent [3] permit alors sa synthèse totale en 1974 [4]. Dès cette période, il apparut que l'hormone pouvait exister sous deux formes : l'une dite linéaire, c'est à dire réduite, et l'autre cyclique, c'est à dire oxydée :



Très vite il apparut d'une part que l'hormone était également produite par le pancréas endocrine [5], et d'autre part que les activités physiologiques respectives des formes cyclique et linéaire sur diverses secrétions endocrines, en particulier d'hormone de croissance, l'insuline et le glucagon, était sensiblement équivalentes [6][7].

Ce n'est qu'en 1980 que la présence d'un analogue immunologique de la somatostatine fut signalée chez l'abeille et chez divers invertébrés [8], puis chez d'autres insectes tels que la blatte [9].

Les effets inhibiteurs de la somatostatine de vertébrés sur l'action hypoglycémiante de l'insuline endo ou exospécifique ont été mis en évidence chez l'abeille [10][11] et une équivalence des formes cyclique et linéaire a été démontrée, sous réserve d'utiliser des concentrations plus élevées de la forme cyclique en ce qui con-

cerne leur action sur les variations de la glycémie consécutives à l'injection de sérum physiologique [12].

Cependant, peu de travaux ont été consacrés à l'action comparée des deux formes de la somatostatine sur le métabolisme lipidique, et le présent travail avait pour objet d'analyser les variations de la lipémie de l'abeille consécutivement à l'injection des formes oxydées et réduite de la somatostatine, par comparaison avec l'injection de sérum physiologique, qui induit une série d'oscillations de la glycémie et de la lipémie sous l'action de décharges hormonales endogènes.

Matériel et Méthodes

Matériel biologique.

Les abeilles naissantes (Apis mellifera, mellifera L.) ont été prélevées dans les alvéoles encore operculés juste avant leur émergence, de manière qu'aucune répercussion de la prise de nourriture ne puisse modifier les paramètres lipémiques et glycémiques initiaux. Les animaux ont été aussitôt introduits par groupes de 10 dans des tubes de Borel garnis de papier filtre humide, et placés à l'obscurité à 22 ± 1°C.

Techniques physiologiques

Au cours des expériences, 215 abeilles d'un poids moyen individuel de 120,7 ± 2,6 mg ont été utilisées. Les injections de sérum physiologique pur [10] ou comportant en solution l'une ou l'autre des deux formes de somatostatine, à raison de 50 ng par individu, ont été effectuées au niveau de l'aorte dorsale à l'aide de microseringues de 5 µl de capacité totale dans un volume utile de 0,5 µl par abeille. Les prélèvements d'hémolymphe ont été opérés à l'aide de microseringues de 50 µl, en premier lieu 10 mn après injections,

puis à intervalles de 45 mn jusqu'à 3 heures. Des volumes de 20 à 25 µl peuvent être extraits pour chaque abeille. Un total de 9 individus est utilisé pour chaque traitement.

Techniques biochimiques

Les échantillons d'hémolymphe ont été additionnés d'un volume deux fois supérieur de mélange chloroforme-méthanol (9-1), agités jusqu'à émulsion complète puis centrifugés 10 mn à 5000g. La phase chloroformique (inférieure) a été recueillie, son volume mesuré, et des dépôts ont été effectués sur plaques chromatographiques revêtues de couches minces de gel de silice (Merck ® référence 5748), à raison de 3 à 5 µl d'équivalent en hémolymphe par dépôt.

Les principales classes de lipides ont été séparées et dosées selon les techniques quantitatives décrites ailleurs [13][14]. Les courbes d'étalonnage ont été établies à partir des substances étalons suivantes, purifiées par SIGMA ® : pour les phospholipides (PL), le mélange équimolaire de phosphatidylinositol et dihydrosphingosine ; pour les stéroïdes, le cholestérol ; pour les acides gras, l'acide palmitoléique ; pour les mono, di et triglycérides, la série oléïque. La précision relative de la méthode est ± 5%.

Techniques statistiques

Les analyses de corrélation et régression linéaires ont été effectuées selon la méthode des moindres carrés. Les probabilités de signification associées aux coefficients de régression ainsi qu'aux analyses de variance (méthode des couples) ont été calculées d'après l'équation de la distribution de "t" de STUDENT, et les variances comparées à l'aide de la distribution de "F" Fisher. Les moyennes et les écarts-types ont été calculés à partir de N=3 mesures. Les pentes de régression sont désignées par a et leur variance par σ_a.

Résultats

La figure 1 présente les variations de concentrations des phospholipides et des triglycérides de l'hémolymphe après injection aux abeilles de sérum physiologique et de somatostatine linéaire ou cyclique (respectivement désignés par : Sr, SmL, SmC).

Les phospholipides présentent, après injection des deux formes de somatostatine, des oscillations de moindre amplitude que celles résultant de l'injection de sérum : l'épreuve de F sur les variances donne respectivement P=0,045 avec la forme linéaire et P=0,118 avec la forme cyclique. Dans les deux cas, les fluctuations s'ordonnent de manière semblable pour les deux somatostatines, mais dans un sens significativement opposé à celui résultant de l'action du sérum (tableau I). Les valeurs moyennes obtenues au cours des 3 heures qui suivent le traitement sont plus faibles après action des somatostatines mais les différences avec les résultats de l'injection de sérum sont davantage significatives dans le cas de la forme cyclique.

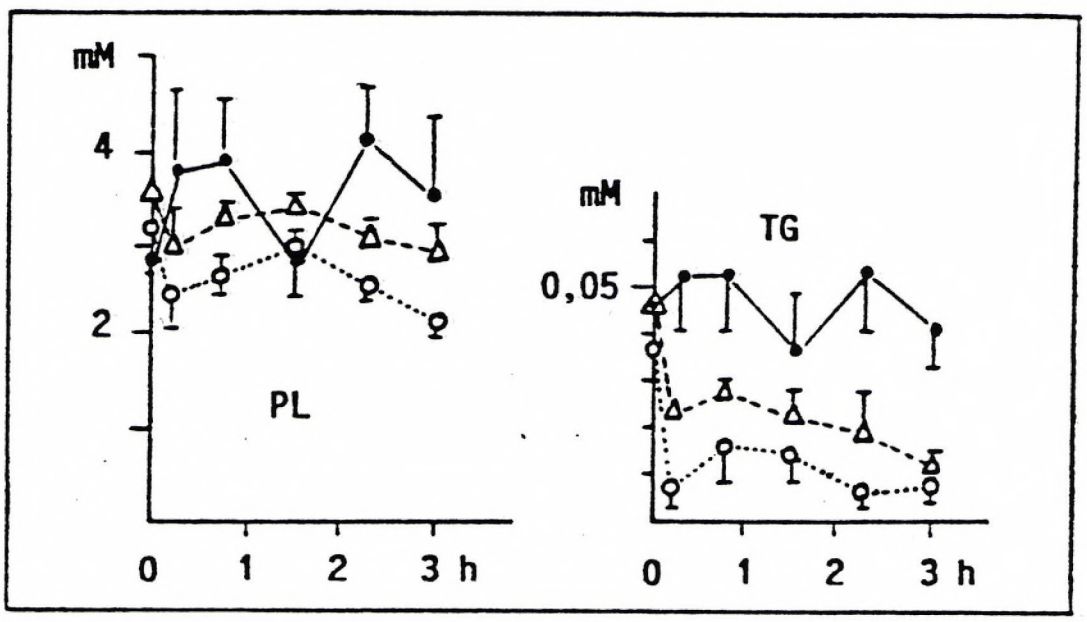


Fig. 1 - Variations des concentrations (mM) de l'hémolymphe d'abeilles en phospholipides (PL) et en triglycérides (TG), après injection de sérum physiologique (Sr) (—•—), de somatostatine linéaire (SmL) (--Δ--) et de somatostatine cyclique (SmC) (...o...). Les moyenneset leurs écarts-types après traitement (N=5) sont respectivement, pour les phospholipides : 3,65(0,46) ; 3,11(0,18) ; 2,52(0,24) et pour les triglycérides : 0,047(0,007) ; 0,020(0,005) ; 0,010(0,004). Les différences sont significatives à P=0,05 dans les cas suivants : phospholipides : entre (Sr) et (SmC) ; triglycérides : entre (Sr) et (SmL ou SmC).

Les concentrations des triglycérides fluctuent, après injection de sérum, autour d'une valeur moyenne identique à la valeur initiale. En revanche, elles diminuent très significativement, respectivement de 58% et 73% après injection de somatostatine linéaire et cyclique : les valeurs obtenues dans ces deux derniers cas ne sont pas différentes entre elles ($P<0,01$), mais s'écartent de la valeur obtenue avec le sérum ($P>0,90$).

L'amplitude des oscillations n'est significativement réduite ni par la somatostatine linéaire : $P(F)=0,31$ ni par la somatostatine cyclique : $P(F)=0,18$, mais l'évolution des concentrations est caractérisée par des corrélations hautement significatives entre somatostatines et non significatives entre chacune des somatostatines et le sérum (tableau I).

Tableau I - Corrélations entre les variations des concentrations respectives (mM) en phospholipides (PL) et en triglycérides (TG) résultant de l'action de l'injection de sérum physiologique (Sr), de somatostatine linéaire (SmL) et de somatostatine cyclique (SmC).

Les paramètres et leur signification sont calculés pour N=6 couples de moyennes. L'astérisque (*) souligne les valeurs dépourvues de signification.

	ρ	$P_{(\rho)}$	a	σ_a
PL :				
SmL / Sr	-0,673	0,14	-0,294	0,161
SmC / Sr	-0,615	0,19	-0,388	0,249
SmC / SmL	+0,925	0,008	1,34	0,274
TG :				
SmL / Sr	0,122*	0,97	0,22*	0,89
SmC / Sr	-0,156*	0,77	-0,26*	0,83
SmC / SmL	0,936	0,006	0,88	0,16

L'examen des résultats présentés sur la figure 1 suggère l'existence de corrélations entre les variations de concentrations des phospholipides et celles des triglycérides : de telles corrélations sont significatives avec chacun des 3 traitements (tableau II).

La figure 2 présente les résultats obtenus avec les stéroïdes et les diglycérides 1-2 et 1-3. Les valeurs moyennes mesurées après injections restent comparables entre elles et aux valeurs initiales dans le cas du sérum et de la somatostatine linéaire : elles sont, en revanche, significativement abaissées ($P<0,05$) après action de la somatostatine cyclique. Par comparaison avec les oscillations consécutives à l'injection de sérum, celles observées en présence de somatostatine linéaire ont une amplitude du même ordre de grandeur ($P(F)=0,49$) tandis que celles induites par la somatostatine cyclique sont significativement atténuées ($P(F)=0,05$). Les séquences des oscil-

Tableau II - Corrélations entre les concentrations (mM) en phospholipides (PL) et en triglycérides (TG) après injection de sérum physiologique (Sr), de somatostatine linéaire (SmL) et de somatostatine cyclique (SmC).

Les paramètres et leur signification sont calculés pour N=6 couples de moyennes

TG / PL	ρ	$P_{(\rho)}$	a	σ_a
Sr	0,795	0,058	0,010	0,0038
SmL	0,788	0,063	0,041	0,015
SmC	0,856	0,029	0,029	0,009

lations induites par les deux formes de somatostatine ne sont qu'en faible corrélation positive, tandis que chacune est en faible corrélation négative avec la séquence correspondant à l'injection de sérum (tableau III).

Dans le cas des diglycérides 1-2 et 1-3, l'amplitude des oscillations est également atténuée de manière plus significative par la somatostatine cyclique ($P_{(F)}$=0,004) que par la forme linéaire ($P_{(F)}$=0,13) ; il en est de même pour les valeurs moyennes après traitement.

Les séquences de variations observées après injection des deux formes de somatostatine sont en étroite corrélation positive entre elles et en faible corrélation négative avec celles obtenues avec le sérum pur (tableau III). Des phénomènes de même sens, mais

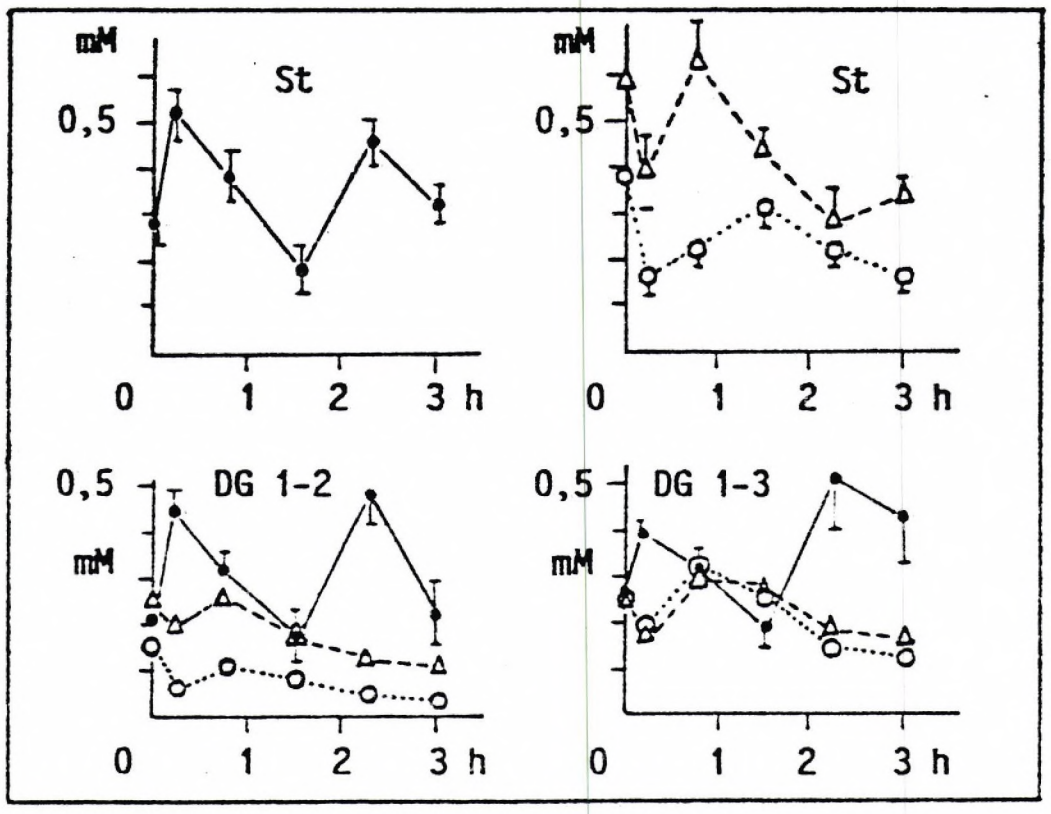


Fig. 2 - Variations des concentrations (mM) de l'hémolymphe d'abeilles en stéroïdes (St), diglycérides 1-2 (DG 1-2) et diglycérides 1-3 (DG 1-3) après injection de sérum (Sr) (—•—), de somatostatine linéaire (SmL) (--Δ--) et de somatostatine cyclique (SmC) (...o...). Les valeurs moyennes et leurs écarts-types après traitement sont respectivement les suivantes :

Stéroïdes : Sr:0,38(0,12) ; SmL:0,42(0,12) ; SmC:0,21(0,05)
DG 1-2 : Sr:0,34(0,12) ; SmL:0,18(0,06) ; SmC:0,054(0,03)
DG 1-3 : Sr:0,093(0,028) ; SmL:0,056(0,012) ; SmC:0,050(0,018)

de plus haute signification sont observés dans le cas des diglycérides 1-3 ; dans ce cas, toutefois, l'atténuation de l'amplitude des variations est plus marquée par la forme linéaire ($P_{(F)}$=0,07) que par la forme cyclique ($P_{(F)}$=0,18) de la somatostatine, et les valeurs moyennes après traitement ne sont pas significativement différentes entre elles.

Les stéroïdes et les diglycérides présentent des variations de même sens : les corrélations présentées dans le tableau IV montrent que le lien le plus étroit s'établit entre les stéroïdes et les diglycérides 1-2 ; la relation entre les formes 1-2 et 1-3 des diglycérides est légèrement affaiblie par les somatostatines.

Les variations des monoglycérides sont illustrées par la figure 3 : l'injection de sérum entraîne, après un temps de latence de 45 mn, une augmentation continue qui atteint + 477% après 3 heures. En revanche, les valeurs moyennes observées après injection des deux formes de somatostatine restent comparables aux valeurs initiales. Les variances correspondantes sont réduites de manière très hautement significative par rapport à celles mesurées avec le sérum, soit respectivement : $P_{(F)}=10^{-5}$ (SmL) et $P_{(F)}=10^{-3}$ (SmC).

Les résultats sont mieux décrits, dans ce cas particulier, par les équations de régression en fonction du temps (tableau V), montrant que l'accroissement des teneurs en monoglycérides s'effectue, après injection de somatostatine, 10 à 30 fois plus lentement qu'après injection de sérum.

L'analyse des variations observées parallèlement dans le cas de l'injection des deux somatostatines par la méthode des couples ne montre aucune différence : t=0,043 ; $P_{(t)}>>0,90$.

Tableau III - Corrélations entre les concentrations (mM) des stéroïdes (St) des diglycérides 1-2 (DG 1-2) et des diglycérides 1-3 (DG 1-3) mesurées après injection de sérum (Sr), de somatostatine linéaire (SmL) et de somatostatine cyclique (SmC).

Les paramètres et leur signification sont calculés pour N=6 couples de moyennes.

L'astérisque (*) souligne les valeurs dépourvues de signification.

	ρ	$P_{(\rho)}$	a	σ_a
Stéroïdes				
SmL / Sr	-0,368*	0,473	-0,412*	0,52
SmC / Sr	-0,643	0,168	-0,459*	0,273
SmC / SmL	0,540*	0,268	0,345	0,268
DG 1-2				
SmL / Sr	-0,277*	0,595	-0,181*	0,313
SmC / Sr	-0,367*	0,474	-0,141*	0,178
SmC / SmL	0,905	0,013	0,533	0,125
DG 1-3				
SmL / Sr	-0,730	0,099	-0,304	0,14
SmC / Sr	-0,735	0,090	-0,438	0,20
SmC / SmL	0,941	0,005	1,35	0,24

Tableau IV - Corrélations entre les concentrations (mM) des stéroïdes (St) et des diglycérides (DG 1-2 et 1-3) de l'hémolymphe d'abeilles après injection de sérum (Sr), de somatostatine linéaire (SmL) et de somatostatine cyclique (SmC).

Les paramètres et leur signification sont calculés pour N=6 mesures de moyennes.

L'astérisque (*) souligne les valeurs dépourvues de signification.

Corrélations :		ρ	$P_{(\rho)}$	a	σ_a
DG 1-3	Sr	0,735	0,095	0,172	0,08
	SmL	0,569	0,238*	0,084*	0,061
DG 1-2	SmC	0,635	0,175*	0,230*	0,140
DG 1-2	Sr	0,935	0,006	0,968	0,183
	SmL	0,948	0,004	0,574	0,095
St	SmC	0,821	0,004	0,459	0,159

* Paramètres faiblement significatifs

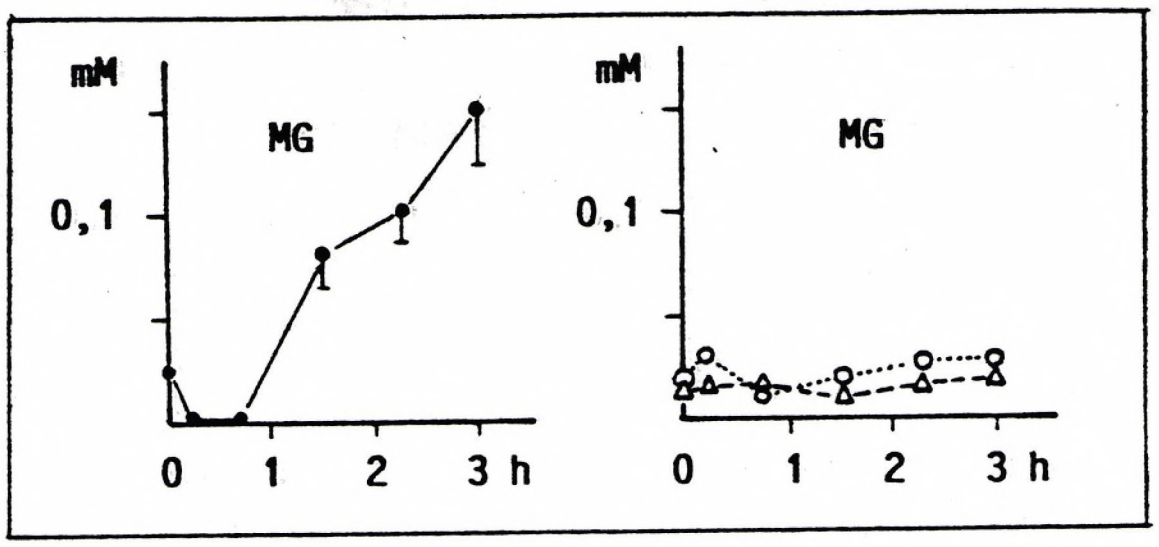


Fig. 3 - Variations des concentrations (mM) des monoglycérides (MG) de l'hémolymphe d'abeilles après injection de sérum (Sr)(— • —), de somatostatine linéaire (SmL)(--Δ--) et de somatostatine cyclique (SmC) (...o...). Les valeurs moyennes et leurs écarts-types après traitement sont les suivantes : Sr:0,066(0,058) ; SmL:0,016(0,003) ; SmC:0,016(0,008).

La figure 4 illustre les variations des concentrations en acides gras consécutives à chacun des traitements. L'amplitude des oscillations consécutives à l'injection des deux formes de somatostatine n'est nullement réduite par rapport à celle correspondant à l'injection de sérum (SmL/Sr : $P_{(F)}$=0,47 ; SmC/Sr : $P_{(F)}$=0,44), de même que les valeurs moyennes après traitements ne diffèrent pas entre elles.

La séquence des variations est tout à fait identique dans le cas des deux somatostatines entre elles : ρ=0,941 (P=0,003) ; a=1,28 ; σ_a=0,23, et sans corrélation significative avec l'action du sérum, soit ρ=-0,30 (P=0,55) avec la forme linéaire, et ρ=-0,24 (P=0,64) avec la forme cyclique.

Les deux formes de somatostatine assignent aux acides gras des variations de même sens que celles des di et triglycérides, contrairement aux effets provoqués par l'injection de sérum. Les corrélations correspondantes sont décrites dans le tableau VI.

Tableau V - Paramètres statistiques des variations en fonction du temps des concentrations (mM) de l'hémolymphe d'abeilles en monoglycérides après injection de sérum (Sr), de somatostatine linéaire (SmL) ou de somatostatine cyclique (SmC).

Les paramètres sont calculés d'après N=6 couples de moyennes. Le symbole R désigne le rapport des pentes a_{sr}/a_{sm}

	ρ	$P_{(\rho)}$	a $(mM.h^{-1})$	σ_a	R
Sr	0,938	0,0056	0,00080	0,00015	
SmL	0,714	0,111	0,000032	0,000016	31
SmC	0,60	0,208	0,000067	0,000045	12

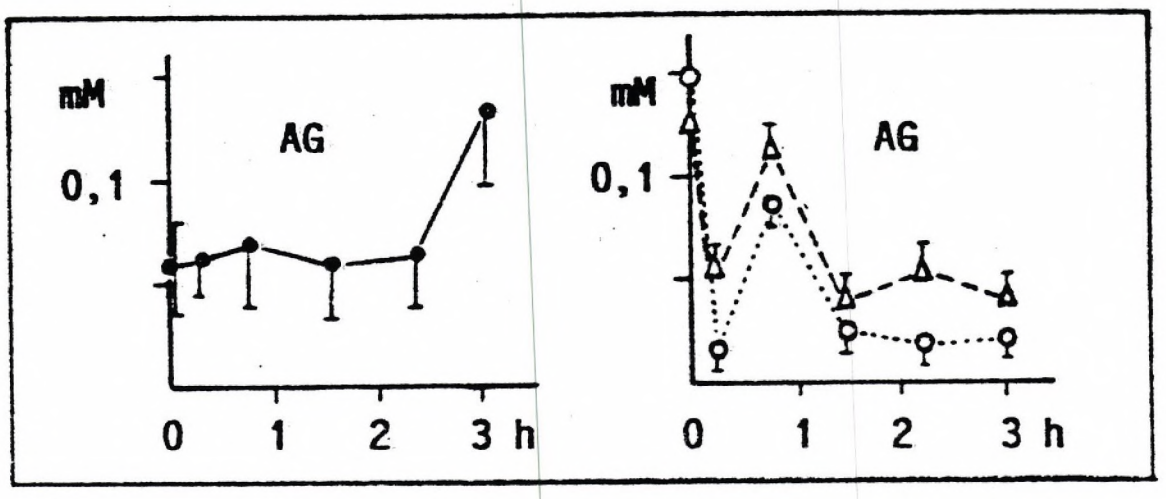


Fig. 4 - Variations des concentrations (mM) de l'hémolymphe d'abeilles en acides gras (AG) après injection de sérum (Sr)(—•—), de somatostatine linéaire (SmL)(--Δ--) ou de somatostatine cyclique (SmC)(...o...). Les concentrations moyennes respectives et leurs écarts-types après traitement sont les suivants : Sr:0,079(0,029) ; SmL:0,061(0,028) ; SmC:0,033(0,027).

Tableau 6 - Corrélations entre les concentrations (mM) des acides gras (AG) et celles de la somme des di et triglycérides (DG+TG) de l'hémolymphe d'abeilles après injections de somatostatine linéaire (SmL), de somatostatine cyclique (SmC) et de sérum physiologique (Sr).

Les paramètres et leur signification sont calculés pour N=6 mesures de moyennes.

L'astérisque (*) souligne les valeurs dépourvues de signification.

	ρ	$P_{(\rho)}$	a	σ_a
SmL	0,938	0,006	0,684	0,126
SmC	0,900	0,014	0,346	0,084
Sr	-0,17*	0,75	-0,033*	0,094

* paramètres non significatifs

Les données numériques exprimées en valeurs relatives sont groupées dans le tableau 7.

Tableau 7. - Evolution de la lipémie de l'Abeille après injection de soluté isotonique (Sl), de somatostatine linéaire (SmL) et de somatostatine cyclique (SmC). Les moyennes, calculées à partir de N=3 mesures, sont exprimées en unités relatives, rapportées aux valeurs initiales indiquées dans le tableau I : les écarts-types figurant entre parenthèses sont donc confondus avec les coefficients de variation. La colonne (σ^2) indique les valeurs des variances dues au traitement au cours de l'intervalle de 10 mn à 3h : les astérisques précisent la signification des différences avec les témoins (Sl) : (*), $P_{(F)} < 0,1$; (**), $P_{(F)} < 0,05$.

		Temps (mn) après injections						
Lipides		0 (témoins)	10	45	90	135	180	σ^2
PL	Sl	1,00(0,26)	1,33(0,26)	1,37(0,26)	0,98(0,18)	1,45(0,26)	1,25(0,25)	0,026
	SmL	1,00(0,10)	0,83(0,10)	0,93(0,02)	0,95(0,04)	0,87(0,10)	0,83(0,09)	0,0025**
	SmC	1,00(0,025)	0,77(0,02)	0,84(0,03)	0,90(0,02)	0,81(0,02)	0,67(0,02)	0,0056*
St	Sl	1,00(0,11)	1,86(0,06)	1,36(0,05)	0,64(0,05)	1,68(0,06)	1,18(0,12)	0,18
	SmL	1,00(0,33)	0,64(0,21)	1,06(0,14)	0,72(0,02)	0,47(0,07)	0,58(0,03)	0,04*
	SmC	1,00(0,11)	0,41(0,13)	0,58(0,14)	0,79(0,10)	0,56(0,14)	0,42(0,187)	0,017**
DG 1-2	Sl	1,00(0,18)	2,04(0,80)	1,45(0,18)	0,86(0,21)	2,23(0,20)	1,05(0,01)	0,35
	SmL	1,00(0,36)	0,80(0,15)	1,16(0,13)	0,68(0,12)	0,44(0,36)	0,48(0,08)	0,067*
	SmC	1,00(0,12)	0,37(0,17)	0,69(0,18)	0,44(0,14)	0,31(0,2)	0,19(0,33)	0,027**
DG 1-3	Sl	1,00(0,25)	1,51(0,17)	1,23(0,21)	0,70(0,30)	1,97(0,20)	1,67(0,24)	0,19
	SmL	1,00(0,23)	0,72(0,17)	1,14(0,23)	1,06(0,09)	0,72(0,17)	0,68(0,11)	0,037*
	SmC	1,00(0,33)	0,78(0,74)	1,28(0,41)	1,05(0,38)	0,60(0,50)	0,48(0,586)	0,085
AG	Sl	1,00(0,40)	1,02(0,37)	1,18(0,50)	0,95(0,55)	1,05(0,48)	2,25(0,57)	0,23
	SmL	1,00(0,32)	0,41(0,13)	0,89(0,55)	0,04(0,15)	0,05(0,09)	0,31(0,10)	0,048*
	SmC	1,00(0,68)	0,09(0,30)	0,60(0,07)	0,03(0,29)	0,02(0,27)	0,15(0,10)	0,035**
MG	Sl	1,00(0,57)	0,00(...)	0,00(...)	3,11(0,06)	3,85(0,06)	5,77(0,07)	5,07
	SmL	1,00(0,15)	1,15(0,20)	1,27(0,12)	0,92(0,50)	1,31(0,18)	1,61(0,47)	0,05**
	SmC	1,00(0,55)	0,16(0,62)	0,62(0,16)	1,00(0,10)	1,25(0,08)	1,00(0,30)	0,14**
TG	Sl	1,00(0,52)	1,00(0,54)	1,15(0,60)	0,80(0,62)	1,17(0,52)	0,89(0,51)	0,021
	SmL	1,00(0,21)	0,48(0,13)	0,57(0,12)	0,45(0,05)	0,37(0,55)	0,24(0,10)	0,012
	SmC	1,00(0,24)	0,16(0,50)	0,43(0,43)	0,38(0,42)	0,17(0,53)	0,18(0,44)	0,013

Les tendances générales hypolipémiantes des deux formes de la somatostatine sont résumées, à partir des moyennes relatives, dans la fig. 5. Seul le cas des monoglycérides échappe à la tendance générale observée pour toutes les autres classes de lipides.

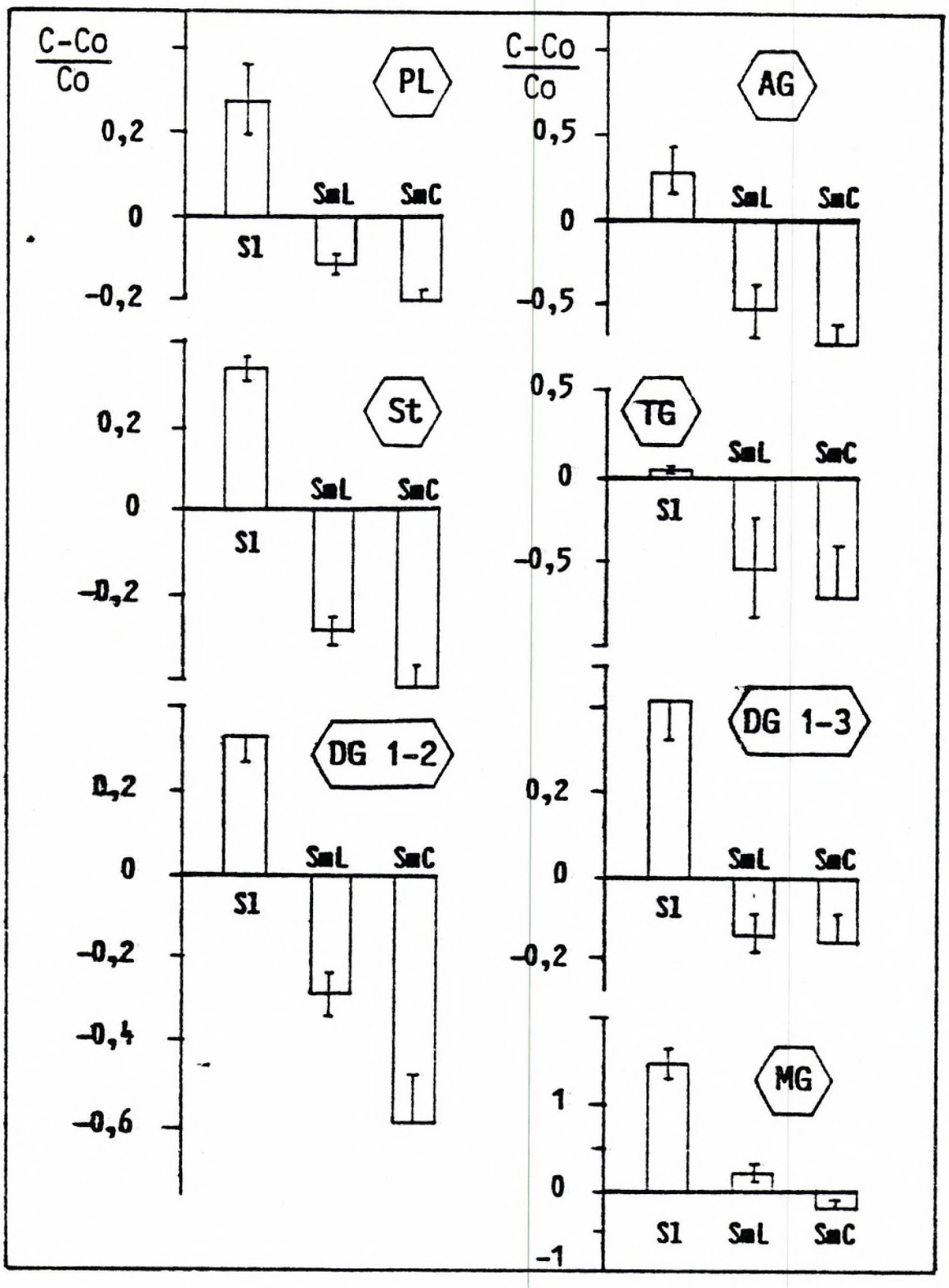


Fig. 5. - Comparaison des écarts algébriques exprimés en unités relatives (C-Co)/Co de la lipémie de l'abeille (C) par rapport aux valeurs initiales Co, au cours des 3 heures qui suivent l'injection de soluté isotonique Sl, de somatostatine linéaire (SmL) et de somatostatine cyclique (SmC). Les valeurs numériques Co sont celles indiquées dans le tableau I. Les écarts types correspondent à 3 mesures. Les classes de lipides sont désignées par les abréviations indiquées dans le texte.

Enfin, la fig. 6 illustre quelques unes des corrélations les plus intéressantes.

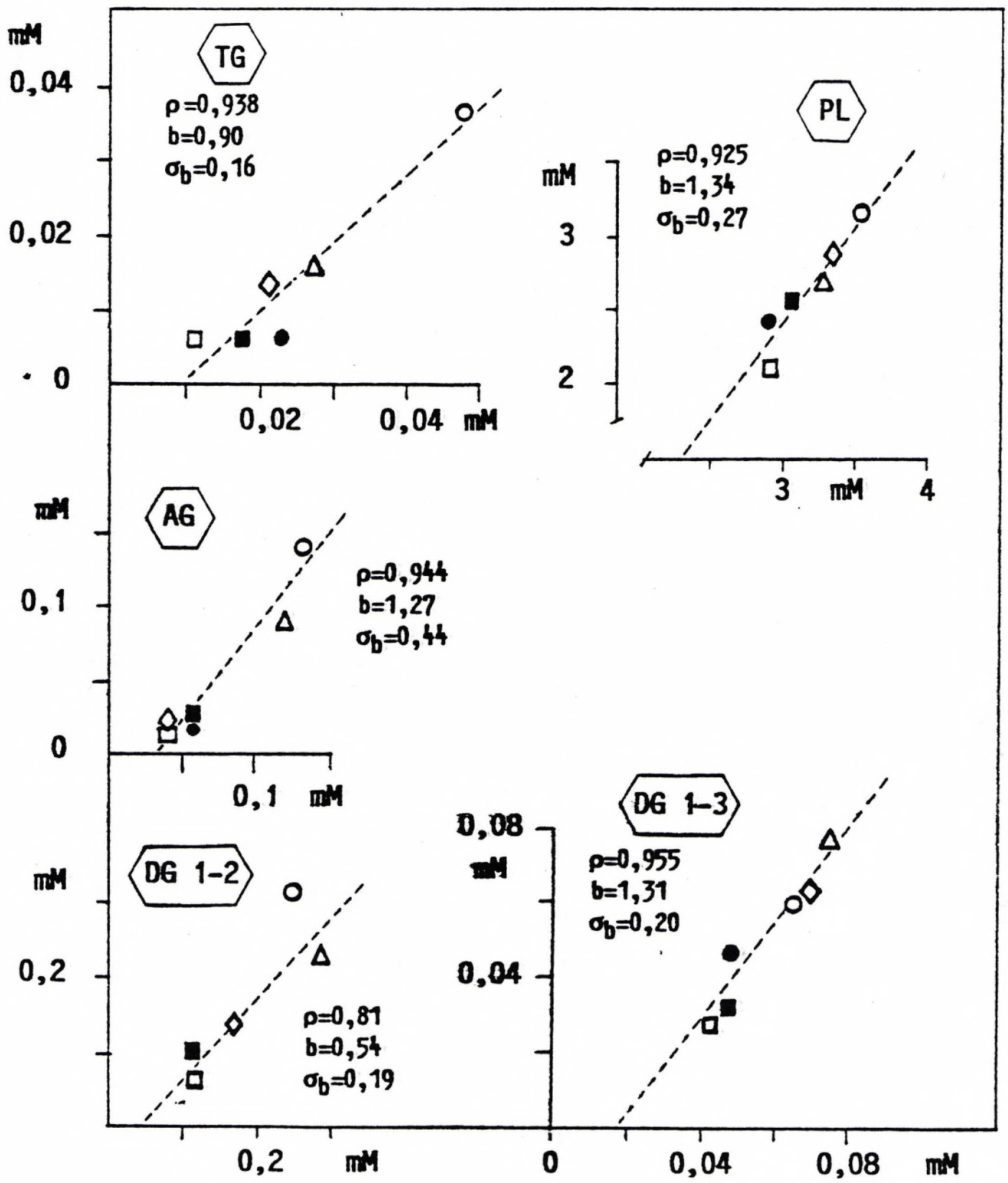


Fig. 6. - Corrélations entre les valeurs respectives de la lipémie (mM) mesurées après injection de somatostatine linéaire (SmL) et de somatostatine cyclique (SmC). Les classes de lipides sont désignées par les abréviations indiquées dans le texte. Les durées après injections sont figurées par les symboles suivants : o = témoins (Co) ; (●) = 10 mn; (△) = 45 mn ; (◊) = 90 mn ; (■) = 135 mn ; (□) = 180 mn.

Discussion

L'injection de sérum physiologique aux abeilles provoque des variations particulières de concentrations de chacune des principales classes de lipides, sous forme d'oscillations autour d'une moyenne voisine de la valeur initiale (phospholipides, stéroïdes, di et triglycérides) ou d'augmentations plus ou moins différées (monoglycérides et acides gras). Ces variations résultent de la mise en oeuvre successive d'hormones endogènes respectivement hyper et hypoglycémiantes.

L'injection de somatostatine a pour trait commun d'entraîner une tendance générale à la diminution des concentrations, plus prononcée à court terme dans le cas des acides gras, des stéroïdes et des triglycérides, ainsi qu'une diminution significative de l'amplitude des oscillations dans le cas des mono, di et triglycérides ainsi que des phospholipides. Dans certains cas, les oscillations sont soit de nature simplement différente de celles observées avec le sérum (cas des acides gras et des triglycérides) soit de sens opposé (stéroïdes, phospholipides, diglycérides). Enfin, la forme cyclique et la forme linéaire de la somatostatine ont entraîné des variations étroitement correlées entre elles, à l'exception du cas des stéroïdes.

Ces résultats confirment tout d'abord, chez l'insecte, l'équivalence d'action des formes oxydée et réduite de l'hormone,déjà signalée chez les vertébrés [6][7]. Les effets observés se produisent à des concentrations du même ordre de grandeur et avec une durée d'action comparable à celle décrite chez les vertébrés [7]. Par ailleurs, contrairement à ce que nous avions observé avec les glucides [11], la somatostatine cyclique agit sur les lipides à la même concentration que la forme linéaire, donnant même dans certains cas des réactions plus significatives.

Les diminutions d'amplitude des oscillations des concentrations en phopholipides, stéroïdes et diglycérides, résultant de l'injection de somatostatine suggèrent l'hypothèse d'une inhibition des décharges hormonales spécifiquement actives sur ces composants. Or, il a été démontré, depuis plusieurs années, que, chez les vertébrés, la somatostatine inhibe les secrétions d'insuline, de glucagon et d'hormones adrénergiques [7][15]. Ces effecteurs sont surtout connus pour leur action sur la glycémie, mais leur action peut également se répercuter au niveau de la lipémie : ainsi, l'insuline diminue l'activité des triglycérides-lipases et peut contribuer, ainsi, à concentrer leurs substrats [16], tandis qu'inversement, une accumulation d'acides gras induit un accroissement de la secrétion d'insuline au détriment de celle du glucagon [17]. La diminution des concentrations en triglycérides observée chez l'abeille, pourrait donc résulter également d'une inhibition par la somatostatine des décharges insulinques endogènes.

Cette observation est en bon accord avec les résultats obtenus par l'administration de somatostatine chez l'homme, montrant un blocage de l'hypertriglycéridémie normalement consécutives à l'ingestion de graisses [19].

D'autre part, nous avons déjà observé, chez l'abeille, que la somatostatine de vertébrés est capable de neutraliser l'induction par une insuline endospécifique d'une corrélation négative entre les glucides et les acides gras [18] : ceci peut également contribuer à limiter les fluctuations de la lipémie éventuellement provoquées par le contrecoup de modifications de la glycémie par des facteurs non contrôlés par la somatostatine (BOUNIAS, non publié).

Les concentrations de l'hémolymphe en acides gras évoluent de manière très différente selon que l'abeille reçoit une injection

de somatostatine ou de sérum physiologique seulement. Ni les valeurs moyennes ni leurs variances ne sont significativement modifiées, mais alors que les teneurs restent stables pendant les deux premières heures qui suivent l'injection de sérum, elles subissent une chute très importante, respectivement de -58% et -90% dans les 10 minutes qui suivent l'injection de somatostatine linéaire et de somatostatine cyclique.

Ces données expérimentales concordent tout à fait avec celles obtenues chez le canard, où l'administration de somatostatine provoque, dès les 5 minutes suivantes, une chute des teneurs plasmatiques en acides gras [20]. Il s'agirait là d'un effet direct, indépendant du fonctionnement du pancréas, et dont nous avons, ici, observé l'équivalent chez l'abeille.

Les résultats sont plus difficiles à interpréter dans le cas des stéroïdes et des phospholipides. La tendance à la diminution induite chez l'abeille par l'injection de la somatostatine cyclique paraît en contradiction avec l'observation d'une augmentation des secrétions biliaires de ces deux classes de lipides après injection de somatostatine à des chiens [21]. Toutefois, il s'agirait là, chez le mammifère, d'effets indirects provoqués par une interruption des secrétions biliaires des stéroïdes et des phospholipides dépendant du glucagon [22] : or, ce mécanisme particulier ne trouve pas nécessairement son équivalent chez un invertébré ne possédant pas les analogues anatomiques du foie et de la vésicule biliaire.

Il est intéressant d'observer que les adrénergiques pourraient avoir, de leur côté, une action inhibitrice sur la secrétion endogène de somatostatine [17][23], ce qui expliquerait, si le même phénomène affecte les abeilles, la forte amplitude des oscillations

observées après injection de sérum, dans la mesure où les adrénergiques endogènes de l'insecte seraient également hyperlipémiants. Cette question, fait précisément l'objet d'une partie de nos travaux en cours, en même temps que la recherche d'une éventuelle spécificité de réponse de certaines classes particulières de lipides à l'action des principales hormones de régulation du métabolisme énergétique sujettes au contrôle par la somatostatine.

Enfin, les résultats observés à court terme, chez l'abeille, suggèrent plutôt une inhibition, directe ou indirecte, de la mobilisation des réserves énergétiques lipidiques (glycérides) par la somatostatine : il n'est guère envisageable, actuellement, pour des raisons de difficultés expérimentales, d'analyser les effets à plus long terme d'une administration répétée de somatostatine qui, paradoxalement, semblerait se traduire, chez le rat, par une augmentation d'activité locomotrice [24].

Références

1 Vale, W., Brazeau, P., Grant, G., Nussey, A., Burgus, R., Rivier, J., Ling, N. et Guillemin, R. (1972) C. R. Acad. Sc. (Paris) 275, 2913-2915

2 Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., et Guillemin, R. (1973) Science 179, 77-79

3 Burgus, R., Ling, N., Butcher, M. et Guillemin, R. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 684-688

4 Rivier, J. (1974) J. Am. Chem. Soc. 96, 2986-2992

5 Dubois, M.P. (1975) Proc. natl. Acad. Sci. USA 72, 1340-1343

6 Efendic, S., Luft, R. et Guillemin, R. (1974) Acta endocrinologica 77, supp. 190, 14

7 Guillemin, R. et Gerich, J.E. (1976) Annu. Rev. Med. 27, 379-388

8 Bounias, M. et Dubois, M.P. (1980) in Dubois, M.P. Int. Congr. 75 Verlammlung der Anatomischen Gesellschaft, Anvers, 7-12 Avril 1980 p.3

9 Iwanaga, T., Fijita, T., Nishiitsutsuji-Uwo, J. et Endo, Y. (1981) Biomed. Res. 2, 202-207

10 Bounias, M. et Dubois, M.P. (1982) C. R. Acad. Sc. Paris 294, 1029-1034

11 Bounias, M., Moreau, R. et Gourdoux, L. (1984) C. R. Soc. Biol. 178, 705-711

12 Bounias, M. (1984) C. R. Soc. Biol. 178, 627-632

13 Bounias, M. (1981) Analusis 10, 31-35

14 Bounias, M. (1983) in L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince, p.p. 83-110, Masson, Paris

15 Lickley, H.L.A., Ross, G.G. et Vranic, M. (1979) Am. J. Physiol. 236, 255-262

16 Hadivanova, N. et Georgiev, G. (1975) Proc. 1st Int. Colloq. Phys. Chem. Bases Biol. Inf. Transfer, 419-426

17 Unger, R.H., Dobbs, R.E. et Orci, L. (1978) Annu. Rev. Physiol. 40, 307-343

18 Bounias, M., Moreau, R. et Gourdoux, L. (1985) C. R. Acad. Sc. (Paris) série III, sous presse

19 Hengl, G., Prager, J. et Pointner, H. (1979) Acta Hepato-Gastro enterol. 26, 392-395

20 Strosser, M.T., Foltzer, C. Cohen, L. et Miahle, P. (1983) Horm. Metab. Res., 279-283

21 Bickerstaff, H.I., Garberoglio, C.A., Baker, A.L. et Moossa, A.R. (1983) Ann. Surg. 198, 168-171

22 Bickerstaff, K.I., Garberoglio, C.A., Baker, A.L. et Moossa, A.R. (1982) Surg. Forum. 33, 204-206

23 Sorenson, R.L., Elde, R.P. et Seybold, B. (1979) Diabetes 28, 899-904

24 Vecsei, L., Bollok, I. et Telegdy, G. (1983) Acta Physiol. Hung. 61, 43-49

2 - Effets adrénergiques agonistes et antagonistes sur la lipémie de l'Abeille (M. BOUNIAS)

La présence de noradrénaline dans les rayons de cire ainsi que dans la tête et l'abdomen des abeilles a été rapportée pour la première fois par Bourdon et coll. (1977), puis confirmée par Lecomte et coll. (1984). Nous avons montré dès 1979 (Bounias et Pachéco) que l'adrénaline présente, chez l'Abeille, une puissante activité hyperglycémique, de même -à un moindre degré, toutefois- que la noradrénaline, ainsi que la dopa et la dopamine dont les effets sont d'autant plus atténués que la structure diffère de celle de l'adrénaline (Bounias, 1980).

Récemment (Bounias, 1985a) la présence de récepteurs de type adrénergique a été confirmée avec l'inhibition par le propranolol (β bloquant) de l'hyperglycémie induite par l'injection de noradrénaline. La question se pose alors de savoir si les récepteurs impliqués sont de type α ou β, ou atypiques (Dickinson et coll., 1981), tandis que l'existence d'un système régulateur aminergique ne peut plus, quant à elle, faire le moindre doute.

La mise en évidence de relations fonctionnelles glucido-lipidiques sous l'action de traumatismes physiologiques, tels que le jeûne, (Bounias, 1985b) ou de traitements hormonaux (Bounias et coll., 1985), suggère que les hormones de régulation de la glycémie pourraient agir également sur la lipémie, soit directement, soit indirectement...

Chez les insectes, glucides et lipides peuvent, d'ailleurs, être utilisés en alternance (Goldsworthy et coll., 1979). Toutefois, chez les Insectes, les chercheurs ont surtout axé leurs efforts sur l'hormone lipotrope (AKH=adipokinetic hormone)(Mayer et Candy, 1979, Van der Horst et al., 1979, etc ...). Chez les Vertébrés, Jamieson et al. (1984) ont montré qu'une perfusion de noradrénaline accroît la consom-

mation d'oxygène, tandis que Gaion et coll. (1984) ont montré que la même hormone libère du glycérol, ce qui suggère un effet lipolytique. Ceci est confirmé par Schoepp et coll. (1984) qui ont montré que les récepteurs α_1 sont impliqués dans l'hydrolyse des phospholipides.

Le présent travail compare l'action d'un agoniste : la noradrénaline, et des antagonistes que sont le propranolol et l'adrénochrome, sur la lipémie de l'Abeille.

Animaux et techniques.

Au cours de la série expérimentale, 290 abeilles naissantes ont été utilisées. Leurs poids moyen individuel était de 119,3 ± 1,6 mg. Les techniques sont les mêmes que celles précédemment décrites. Les injections ont été effectuées en milieu soluté isotonique, à raison des concentrations suivantes, par abeille :

noradrénaline (NrAd) : 1 nmole ◊ volume total : 0,5 µl par abeille
Propranolol (Prpl) : 2,5 nmole ◊ les témoins ont reçu 0,5 µl de
adrénochrome (AdCh) : 1 nmole soluté physiologique

Abréviations des lipides : PL=phospholipides ; St=stéroïdes ; AG=acides gras ; DG=diglycérides ; TG=triglycérides.

Résultats

Les variations des PL, St et DG 1-2 sont présentées sur la fig. 7. Le propranolol entraîne des oscillations de plus grande amplitude que la NrAd ($P_{(F)}$=0,008) et le soluté seul ($P_{(F)}$=0,001), le mélange des deux donne un résultat intermédiaire mais encore très significatif par rapport à la NrAd ($P_{(F)}$=0,004) ou aux témoins ($P_{(F)}$=0,008). La NrAd tend à abaisser les PL (P=0,02). L'adrénochrome présente des effets de même type, les valeurs minimales étant atteintes plus tard (90 mn au lieu de 45 mn). Ces deux traitements provoquent des oscil-

lations de même amplitude et une même moyenne globale ($P_{(F)}$=0,28 ; $P_{(t)}$=0,93). Aucune corrélation n'apparaît entre ces deux traitements (ρ=-0,27). A noter que le 1er pic du Prpl est éliminé en présence de NrAd.

Les St et DG 1-2 montrent des variations de même allure, décrites par les paramètres de corrélation/régression présentés dans le tableau 8.

Table 8 - Correlation and regression parameters of steroid and 1-2 diacylglycerol versus phospholipid levels according to treatments (N=6 pairs). Slopes are designated by b and their variances by σ^2_b.

	ρ	P(ρ)	b	σ^2_b
St/PL :				
NrAd	0.839	0.036	0.0397	0.0128
NrAd++ Prpl	0.979	0.0007	0.0464	0.0050
Prpl	0.978	0.0007	0.0548	0.0060
AdCh	0.578	0.22[b]	0.0375	0.0264
Sa	0.612	0.19[b]	0.0606	0.0391
1-2 DG/PL :				
NrAd	-0.27	0.60[a]	-0.0072	-
NrAd + Prpl	0.905	0.013	0.0284	0.0070
Prpl	0.935	0.006	0.0392	0.0074
AdCh	0.725	0.10	0.0176	0.0083
Sa	0.850	0.032	0.0617	0.0191

([a]) out of significance ([b]) weakly significant

Il est intéressant de noter l'absence de corrélation entre PL et St d'une part et DG 1-2 d'autre part, sous l'action de la NrAd.

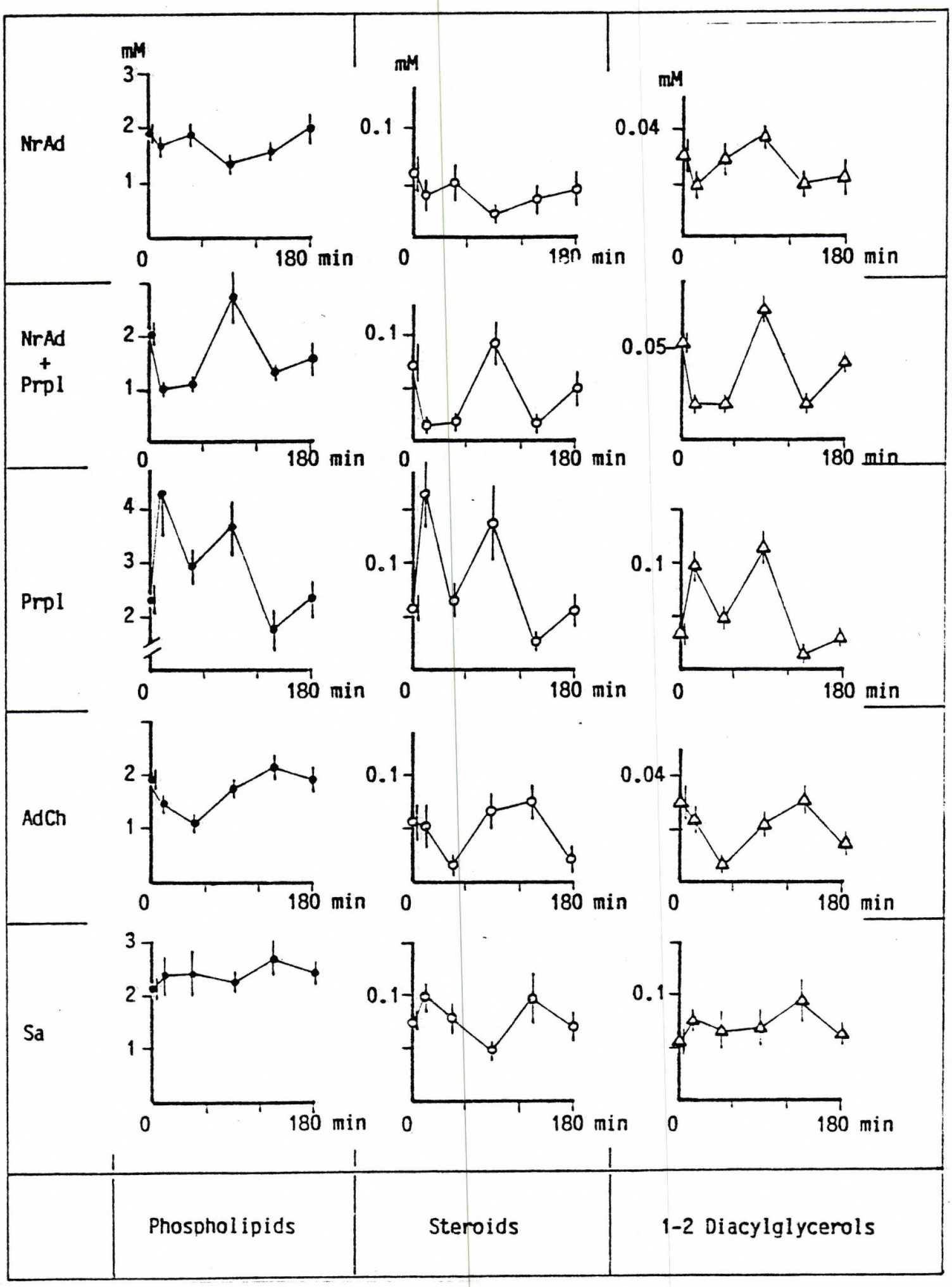


Fig. 7 - Cinétiques de variations des concentrations de l'hémolymphe en phospholipides, stéroides et diacyl 1-2 glycérols (mM) après injections de noradrénaline (NrAd) pure ou en présence de propranolol (Prpl), adrenochrome (AdCh) et soluté physiologique (Sa). Les moyennes et les écarts-types (indiqués par les barres verticales) sont calculés à partir de N=3 déterminations.

La fig. 8 présente les variations des DG 1-3, AG et TG. Il apparaît alors que ce sont, ici, les DG 1-3 qui suivent des variations correlées à celles de PL et des St : les paramètres respectifs sont : ρ=0,614 (P=0,19) et ρ=0,641 (P=0,17). Ces corrélations sont affaiblies par l'accroissement insuffisant des DG 1-3 à 180 mn (NrAd) et 90 mn (NrAd+ Prpl). Ces points exclus, les calculs donnent :

pour NrAd ρ = 0,845 (P=0,03) ; b=0,024 (σ_b=0,0075)

pour NrAd+Prpl ρ = 0,975 (P=0,001); b=0,011 (σ_b=0,0012)

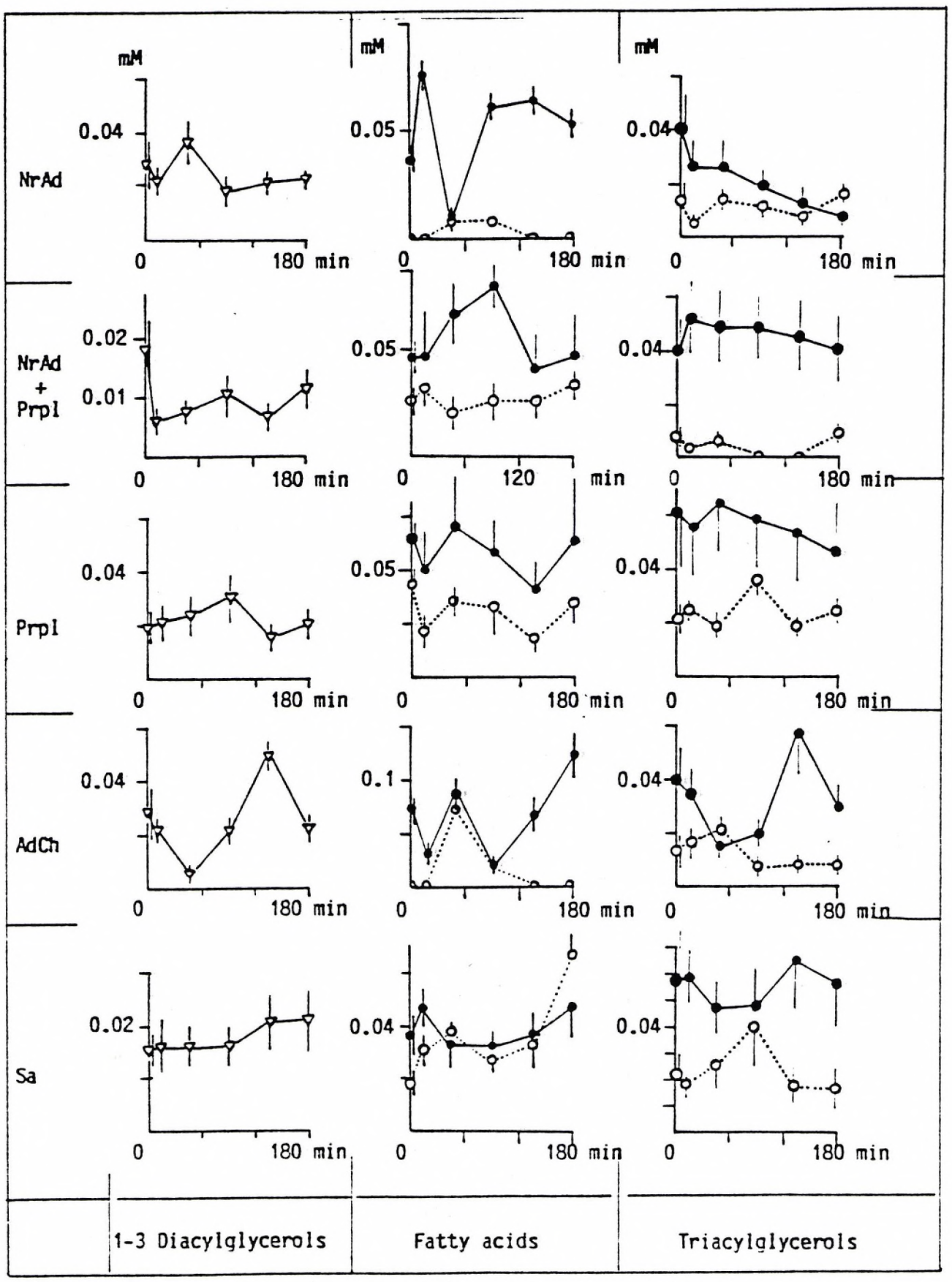


Fig. 8 - Cinétiques de variations des concentrations de l'hémolymphe en diacyl 1-3 glycérols, acides gras et triglycérides, après injections de noradrénaline (NrAd) pure ou en présence de propranolol (Prpl), adrenochrome (AdCh) et soluté physiologique (Sa). Les moyennes et les écarts-types sont calculés à partir de N=3 déterminations. Les acides gras et les triglycérides sont présents sous 2 formes principales : [1] (— o —) et [2] (••• o •••) respectivement de chaînes courtes et longues.

Les valeurs moyennes après traitement (tableau 9) ne diffèrent pas statistiquement, sauf dans le cas du traitement NrAd+Prpl. Les variations de plus grande amplitude sont observées avec l'AdCh : $P_{(F)}$=0,004 vis-à-vis des témoins.

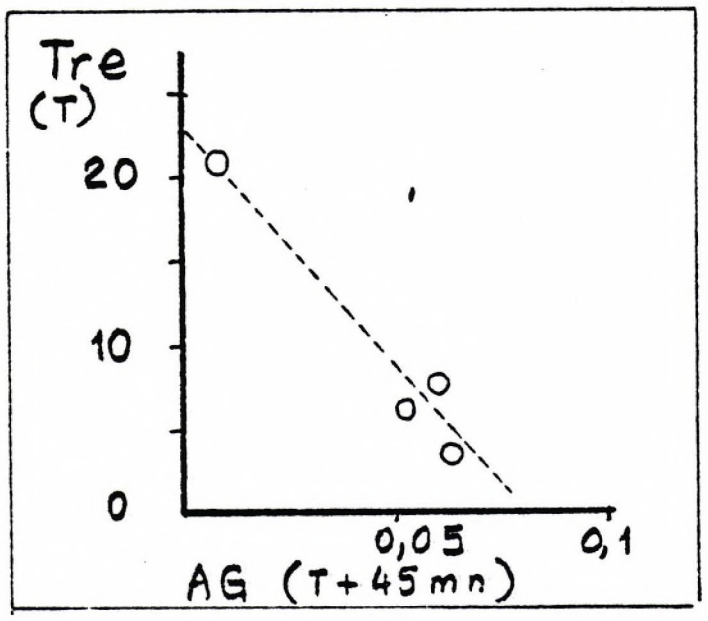


Fig. 9 - Décalage de phase révélant une corrélation négative entre AG et Tre dans l'hémolymphe d'abeilles après injections de NrAd.

Les correspondances sont les suivantes :

Tre	10 mn	45 mn	90 mn	135 mn
AG	45 mn	90 mn	135 mn	180 mn

Le cas des acides gras est difficile à analyser. Aucune corrélation n'apparaît avec les autres classes de lipides, ni avec les glucides -(Bounias, 1985)- Toutefois, un décalage de phase peut être observé dans ce dernier cas, entre les AG et la tréhalosémie : la fig. 9 illustre la corrélation observée en portant respectivement les variations de la tréhalosémie en fonction de celles des AG décalées de 45mn: pour N=5 couples : ρ=-0,941 (P=0,005) ; b=-0,003 (σ_b=0,006).

Tableau 9 - Moyennes et variances des diglycérides 1-3 de l'hémolymphe d'Abeilles au cours des 3 heures qui suivent chaque traitement (N=5). Les témoins sont désignés par Co. Abréviations : voir le texte.

	$\bar{x}$	$\sigma^2_{\bar{x}}$	Co	σ_{Co}
NrAd	0.024	$0.053.10^{-3}$	0.028	0.009
NrAd + Prpl	0.0093^{a}	$5.2.10^{-6}$	0.018	0.005
Prpl	0.022	$0.03.10^{-3}$	0.019	0.005
AdCh	0.025	$0.196.10^{-6}$	0.028	0.009
Sa	0.018	$7.5.10^{-6}$	0.015	0.003

(^{a}) significantly different from controls Co and Sa

Par ailleurs, une corrélation entre les 2 formes d'AG apparaît sous l'action du Prpl : ρ=0,881 (P=0,02) ; b=-0,74 (σ_b=0,20) mais elle est détruite en présence de NrAd : ρ=-0,48 (P=0,33)

Les variations des TG (forme 1) montrent une diminution régulière, dépeinte par les paramètres cinétiques, en régression linéaire : ρ=-0,935 (P=0,006) ; b=0,15.10^{-3} mM/mn ; σ_b=0,03 u. L'ordonnée à l'origine a=0,033 mM est proche de la valeur initiale Co ≃ 0,04 mM. Ici encore, l'AdCh provoque des fluctuations de forte amplitude, ($P_{(F)}$<0,11). Le tableau 10 résume les variations globales des AG et des TG.

Il apparaît, enfin, une corrélation entre les variations des DG 1-3 et celles des TG : ρ=0,939 (P=0,005) ; b=1,1 (σ_b=0,04).

		NrAd	NrAd + Prpl	Prpl	AdCh	Sa
FA [1]	$\bar{x}$	0.052	0.065	0.057	0.033	0.039
	$10^3 \times \sigma^2_{\bar{x}}$	0.65	0.37	0.15	0.44	0.055
	C_o	0.037	0.052	0.065	0.037	0.036
	σ_{C_o}	0.009	0.010	0.003	0.009	0.009
FA [2]	$\bar{x}$	0.036[a]	0.030	0.026	0.010	0.039
	$10^3 \times \sigma^2_{\bar{x}}$	0.025	0.036	0.068	0.28	0.24
	C_o	0.00	0.028	0.042	0.00	0.018
	σ_{C_o}	-	0.006	0.014	-	0.004
TG [1]	$\bar{x}$	0.018[a]	0.047	0.056	0.031	0.056
	$10^3 \times \sigma^2_{\bar{x}}$	0.066	0.020	0.045	0.26	0.059
	C_o	0.040	0.039	0.062	0.040	0.056
	σ_{C_o}	0.013	0.012	0.022	0.013	0.020
TG [2]	$\bar{x}$	0.011	0.004	0.025	0.012	0.024
	$10^3 \times \sigma^2_{\bar{x}}$	0.017	0.015	0.049	0.038	0.11
	C_o	0.013	0.008	0.021	0.013	0.021
	σ_{C_o}	0.006	0.002	0.002	0.006	0.006

(a) significant differences from C_o
(b) significant differences from $\sigma^2_{\bar{x}}$ (Sa)

Moyennes ($\bar{x}$) et variances (σ^2) des acides gras et des triglycérides de l'hemolymphe d'Abeilles au cours des 3 heures qui suivent les traitements (N=5). Les témoins sont indiqués respectivement par [1] et [2].

Discussion et conclusions

Certaines remarques peuvent être faites de manière significative. Les PL sont abaissés par la NrAd : ceci concorde avec les résultats de Schoepp et coll. (1984) montrant qu'une stimulation des récepteurs α_1 est associée à une hydrolyse des PL : **L'action NrAd sur les PL de l'abeille se manifesterait donc par l'intermédiaire de récepteurs α !.** Il convient de noter, au passage, que l'Adrénaline déprime l'activité des glycérol-P-acyl-transférases d'où résulte une activité lipolytique apparente bloquée par le propranolol, donc impliquant des récepteurs β (Sooranna et Saggerson, 1984).

Selon Sugihara et coll. (1983) la NrAd présente une activité lipolytique via l'AMPc, dont les concentrations sont fortement augmentées après injection de NrAd dans des tissus cérébraux (Shickley et coll. 1984).

D'autre part, la NrAd stimule les TG-lipases inhibables par l'insuline (Hadivanova et Georgiev, 1975). Or, nous observons précisément une décroissance des TG (35 et 61%) sous l'action de la NrAd, mais le phénomène est neutralisé par le β bloquant (Prpl).

Les St et DG 1-2 subissent également une chute de concentrations 10 mn après injections de NrAd (respectivement de 36 à 40%).

Il est intéressant de noter que dans le même temps, les AG augmentent de 105 %, ce qui concorde avec les résultats obtenus par Moericke et coll. (1981) chez l'homme. Quantitativement, il apparaît 0,039 mM d'AG, en même temps que l'abaissement des TG (-0,014 mM et -0,008 mM), des DG 1-2 (-0,012 mM) et des DG 1-3 (-0,007 mM) représente un total de 0,041 mM, soit l'équivalent. Cela suppose, dans l'hypothèse d'une hydrolyse directe, qu'un groupe de MG et DG soit écarté des complexes

circulants (lipo protéines de l'hémolymphe).

Déjà en 1968, Bhaktan et Gilbert avaient montré in vitro que l'adrénaline pouvait libérer des acides gras à partir d'extraits de corps adipeux incubés dans l'hémolymphe. Les mêmes expériences ont montré, à l'inverse, une inhibition de la libération des DG, ce qui concorde également avec nos résultats globaux, in vivo.

En revanche, Chang (1974) a obtenu une libération de DG aussi bien que de TG, également par incubation de corps adipeux de lépidoptères dans l'hémolymphe : or ceci n'est pas nécessairement contradictoire, car des insectes appartenant à différents ordres présentent des particularités quant à l'utilisation préférentielle des sources d'énergie. Récemment, Wegener (1983) l'a bien montré en calculant le QR de tissus cérébraux :

Bombyx mori (lépidoptère) : QR=0,74 (dominante lipidique)

Apis mellifera (hyménoptère)
QR=1,0 (dominante glucidique)
Calliphora (diptère)

Il serait intéressant d'étudier la répartition des lipides dans les diverses structures lipoprotéiques de l'abeille (3 selon Ryan et coll. 1985) en fonction des traitements : le métabolisme lipoprotéine et son contrôle a été largement discuté par Foster (1982), Steiner et coll. (1982), le et coll. (1982), en relation avec les divers "compartiments" physiologiques.

Nos expériences suggèrent que le principal complexe lipo protéique, contenant les classes PL, St et DG est affecté par des récepteurs dont la classification en α ou β ne peut être tranchée : peut-être s'agit-il de récepteurs mixtes ou d'affinité modulaire. En outre, la NrAd parait stimuler une interconversion des deux formes DG 1-2 et DG 1-3: ceci répond peut-être à une question soulevée au sujet de la trans-

formation PL DG 1-3, parfois observée après injection de soluté physiologique (Bounias et coll., 1986 : Insect Biochem., sous presse).

La figure 10 illustre les principaux éléments de la discussion

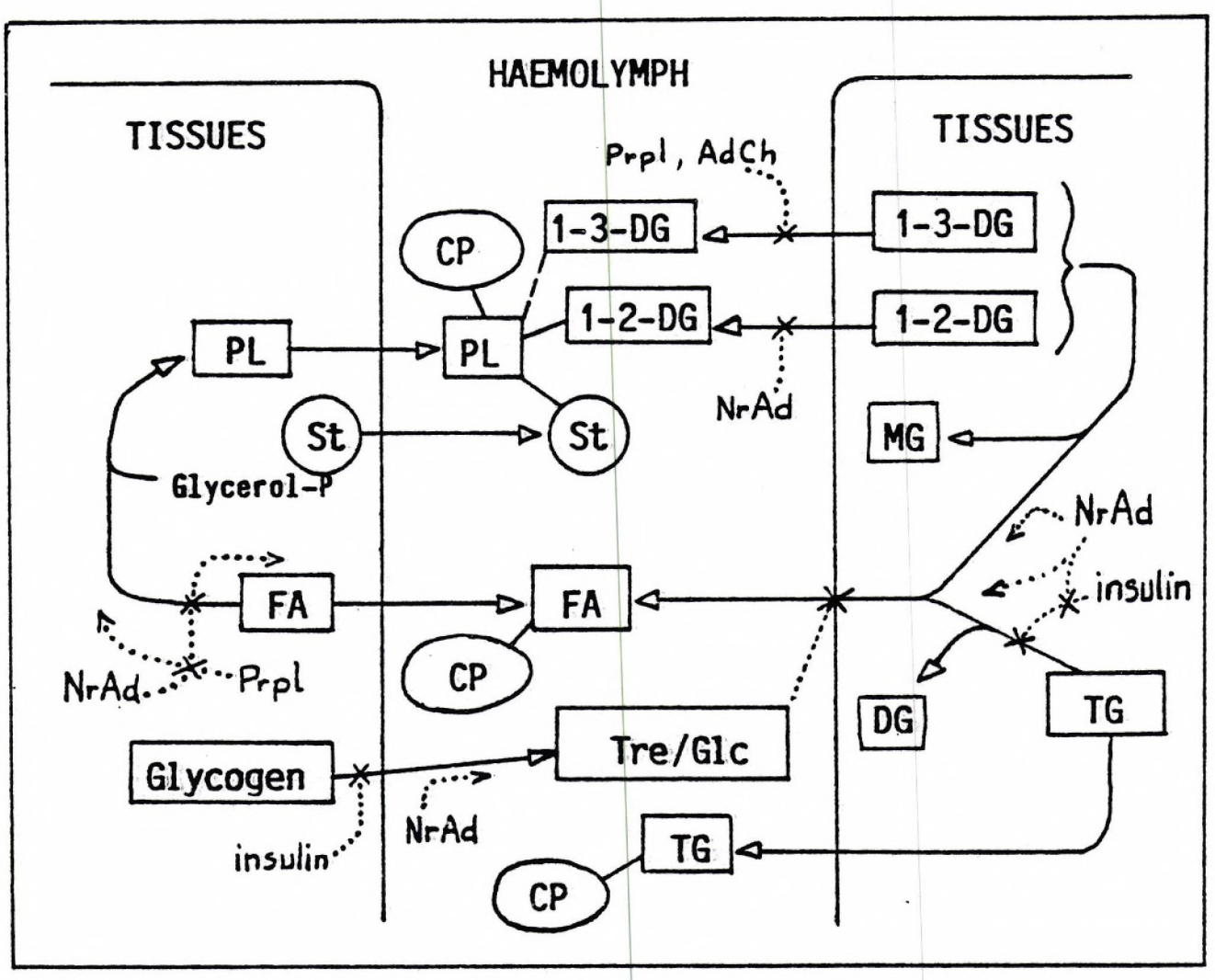


Fig. 10 - Schéma interprétatif des sites d'action de la noradrénaline (NrAd), du propranolol (Prpl) et de l'adrénochrome (AdCh) sur le métabolisme lipidique de l'abeille.

Biosynthèse et transport
inhibition
stimulation

MG = monoglycérides
CP = protéines transporteuses

En conclusion, l'activité lipolytique de la nor-adrénaline, connue chez les vertébrés, est confirmée chez l'abeille in vivo. Le propranolol présente une activité antagoniste au niveau des PL, des St et des DG, tous impliqués vraisemblablement dans une même structure lipoprotéique. Les récepteurs impliqués présentent à la fois des caractères de type α et de type β : or, selon Martin et coll. (1981), l'hyperglycémie adrénergique serait de type α dans le foie et β dans les muscles, tandis que l'activité lipolytique dépendrait de récepteurs α.

Il serait permis de formuler, maintenant, l'hypothèse que les récepteurs pourraient être mixtes, mais présenter certains caractères de type α ou de type β selon la manière dont ils sont sollicités.

REFERENCES

ALEKSANDROV S. (1977) Effect of insulin and thyroxine on phosphorus-32 incorporation in the phospholipids of chicken intestinal mucose. Zhivotnovud. Nauki, **14**(7), 115-119

BEENAKKERS A.M.T., VAN DER HORST D.J. and VAN MARREWIJK W.J.A. (1981) Role of lipids in energy metabolism. In : R.G.H. DOWNER Ed., "Energy metabolism in Insects". Plenum Press, 84-90

BOUNIAS M. (1976) Micro analyse quantitative de quelques métabolites de l'hémolymphe d'Insectes. I - Les glucides libres. Analusis **4**, 87-93

BOUNIAS M. (1978) Intra-glycemic relations occuring during the development of honeybee workers (Apis mellifica, mellifica L.) Comp. Biochem. Physiol., **61A**, 13-18

BOUNIAS M. (1979) Relations doses/effets de l'insuline et du glucagon sur la glycémie de l'Abeille, C.R. Soc. Biol., **173**, 1031-1036

BOUNIAS M. (1980) N(1-naphthyl) ethylenediammonium dichloride as a new reagent for nano-quantification of glucids on thin-layer plates by a mathematical calibration process. Analyt. Biochem., **106**, 291-295

BOUNIAS M. (1981) Micro-analyse quantitative par chromatographie sur couche mince de quelques métabolites de l'hémolymphe d'Insectes. III - Les lipides. Analusis, **10**, 31-35

BOUNIAS M. and DUBOIS M.P. (1980) Présence chez les invertébrés de facteurs neuroendocriniens immunologiquement apparentés aux hormones de Vertébrés. Internat. Congr. 75 Versammlung der Anatomischen Gesellschaft. Anvers 7-12 Avril 1980, p. 3

BOUNIAS M. and DUBOIS M.P. (1982) Inhibition de l'action hypoglycémiante de l'insuline par la somatostatine chez l'Abeille in vivo. C.R. Acad. Sc. (PARIS), série III, **294**, 1029-1034.

BOUNIAS M. and PACHECO H. (1979a) Sensibilité de la glycémie de l'Abeille à l'action de l'insuline et du glucagon injectés in vivo. C.R. Acad. Sc., **289D**, 201-204.

BOUNIAS M. and PACHECO H. (1979b) Effets hyperglycémiants de l'adrénaline injectée chez l'Abeille in vivo. C.R. Acad. Sc., **289D**, 33-36.

BURGUS R., LING N., BUTCHER M. and GUILLEMIN R. (1973) Primary structure of somatostatin, a hypothalamic peptide that inhibits the secretion of pituitary growth hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), **70**, 684-688.

CANDY D.J. and KILBY B.A. (1961) The biosynthesis of trehalose in the locust fat body. Biochem. J., **78**, 531-536.

EFFENDIC' S., LUFT R. and GUILLEMIN R. (1974) The effect of somatostatin on glucose induced insulin release in rats. Acta endocrinol., **77**, suppl. 190, 14.

EL SALHY M., ABOU-EL-ELA R., FALKMER S., GRIMELIUS L. and WILANDER E. (1980) Immunohistochemical evidence of gastro-entero-pancreatic neurohormonal peptides of vertebrate type in the nervous system of the larva of a dipteran insect, the hoverfly, Eristalis aeneus. Regulatory peptides, **1**, 187-204.

EL SALHY M., FALKMER S., KRAMER K.J. and SPEIRS R.D. (1983) Immunohistochemical investigations of neuropeptides in the brain, corpora cardiaca and corpora allata of an adult lepidopteran insect, Manduca sexta (L.). Cell Tissue Res.,

EMDIN S.O. and FALKMER S. (1977) Phylogeny of insulin. Some evolutionary aspects of insulin production with particular regard to the biosynthesis of insulin in Myxine glutinosa. Acta Paediatr. Scand., Suppl., **270**(Insulin Juv. Diabetes), 15-25.

FRIED S.K., LAVAU M. and PI-SUNYER F.-X. (1981) Role of fatty acid synthesis in the control of insulin-stimulated glucose utilization by rat adipocytes., J. Lipid Res., **22**(5), 753-62.

FRIEDMAN S. (1967) Occurence of trehalose-6-phosphate in Phormia regina Meig., Arch. Biochem. Biophys., **88**, 69-211.

FRIEDMAN S. (1971) Interactions among sites responsible for trehalose--6-phosphate and trehalose activated glucose-6-phosphate hydrolysis on trehalose phosphate isolated form Phormia regina. J. Biol. Chem., **246**, 4122-4130.

FUKUDA H. and IRITANI N. (1983) Effect of insulin-treatment on age-dependent decrease of lipogenic enzyme induction. Biochim. Biophys. Acta, **760**, 149-153.

GOLDSWORTHY G.J., JUTSUM A.R. and ROBINSON N.L. (1979) Substrate utilization and flight speed during tethered flight in the locust. J. Insect Physiol., **25**, 182-185.

GRIMALDI P., FOREST C., POLI P., NEGREL R. and AILHAUD G. (1983) Modulation of lipid synthesizing enzyme by insulin in differentiation of 17 adipose-like cells. Biochem. J., **214**, 443-449.

HADIVANOVA N. and GEORGIEV G. (1974) Insulin and adrenaline effect on lung triglyceride lipases. Phys. Chem. Bases Biol. Inf. Transfer, [Proc. Int. Colloq.], 1st, (Pub. 1975), 419-26.

HENGL G., PRAGER J. & POINTNER H. (1979) The influence of somatostatin on the absorption of triglycerides in partially gastrectomized subjects. Acta Hepato-Gastro-enterol., **26**, 392-395.

HOFFMANN A.G.D. and DOWNER R.G.H. (1977) Diacylglycerol as major end products of triacylglycerol phydrolysis by tissue lipases of the cockroach., Am. Zool., **17**, 943.

IWANAGA T., FUJITA T., NISHIITSUTSUJI-UWO J. and ENDO Y. (1981) Immunohistochemical demonstration of PP-somatostatin, enteroglucagon and vip-like immunoreactivities in the cockroach midgut, Biomedical Res., **2**, 202-207.

JAHASIRDAR A.P., DOWNER R.G.H. and VISWANATHA T. (1984) Influence of octopamine on trehalase activity in muscle and hemolymphe of the American cockroach, Periplaneta americana L., Biochim. Biophys. Acta, **801**, 177-83.

JOHNSON D.G., ENSINCK J.W., KOERKER D., PALMER J. and GOODNER C.J. (1975) Inhibition of glucagon and insulin secretion by somatostatin in the rat pancreas perfused in situ, Endocrinology, **96**, 370-374.

KHADDZHIIVANOVA N., KUMANOV K., MINCHEVA R., DIMITROV G. and GEORGIEV G. (1981) Insulin effect on lung subcellular fraction phospholipids and cholesterol. Clin. Respir. Physiol., **17**, 53-64.

KRAMER K.J. (1979) Insulin-like and glucagon-like hormones in insects. In : Experimental Entomology : Insect Neurohormones (Miller, T.A. ed.) pp 116-136. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

KRAMER K.J. (1984) Vertebrate hormones in insects. In : Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 7, Pergamon Press, New York.

LEGAY J.M., CHASSE J.L., MOURGUES C., PONTIER J. and TEULADE P. (1966) Exercices de statistiques pour Biologistes. Flammarion Ed., 309 p.

LEROITH D., LENSIAK A. and ROTH J. (1981) Insulin in insects and annelids, Diabetes, **30**, 70-76.

LIEN E.L. and GARSKY V.M. (1978) Prolonged suppression of insulin release by a somatostatin analog. Endocrinology (Philadelphia), **103**, 81-5.

MARY P.L. and RAO J.P. (1981) Type of adrenoceptors involved in induction by adrenaline of hepatic alkaline phosphatase in mice in vivo. Br. J. Pharmacol., **72**, 8-9.

MAIER V., WITZNIEK G., KELLER R. and PFEIFER E.F. (1978) Insulin-like and glucagon-like immunoreactivities in the honeybee (Apis mellifera), Acta Endocrinol., **87**, Suppl. 215, 69-70.

MAYER R.J. and CANDY D.J. (1969) Control of hameolymph lipid concentration during locust flight : An adipokinetic hormone from the corpora cardiaca. J. Insect Physiol., **15**, 611-620.

MENEZES P. and ORTIZ M. (1975) A protein extract from Drosophila melanogaster with insulin-like activity. Comp. Biochem. Physiol. **51A**, 483-485.

MOREAU R., RAOELISON C. and SUTTER B. Ch. J. (1981) An intestinal insulin-like molecule in Apis mellifica L. (Hymenoptera), Comp. Biochem. Physiol., **69A**, 79-83.

MWANGI R.W. and GOLDSWORTHY G.J. (1977) Inter-relationships between haemolymph lipid and carbohydrate during starvation in Locusta, J. Insect Physiol., **23**, 1275-1280.

NOE B.D., FLETCHER D.J. and SPIESS J. (1979) Evidence for the existence of a biosynthetic precursor for somatostatin. Diabetes, **28**, 724-730.

O'NEILL I.E. and LANGSLOW D.R. (1978) The action of hydrocortisone, insulin, and glucagon on chicken liver hexokinase and glucose--6-phosphatase and on the plasma glucose and free fatty acid concentrations. Gen. Comp. Endocrinol., **34**, 428-437.

PEARSON D., SHIVELY J.E., CLARK B.R., GESCHWIND I.I., BARKLEY M., NISHIOKA R.S. and BERN H.A. (1980) Urotensin II : A somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **77**, 5021-5024.

POLONOVSKI M., BOULANGER P., MACHEBOEUF M. and ROCHE J. (1973) "Régulation de la biosynthèse des acides gras" in : Biochimie Médicale, vol. **II**, Masson Ed., p. 170.

RAABE M. (1982) in : Insect Neurohormones, Plenum press, New York and London, 352 pp.

RIVIER J. (1974) Somatostatin : total solid phase synthesis, J. Am. Chem. Soc., **96**, 2986-2992.

SADUR C.N. and ECKEL R.H. (1983) Insulin-mediated increases in the HDL cholesterol/cholesterol ratio in humans. Arteriosclerosis (Dallas), **3**, 339-343.

STEELE J.E. (1961) Occurence of a hyperglycaemic factor in the corpus cardiacum of an insect. Nature (London), **192**, 680-681.

STEELE J.E. (1981) Role of carbohydrate metabolism in physiological function. In : R.G.H. DOWNER Ed. "Energy Metabolism in Insects". Plenum press, 103-106.

TELLER J.K., ROSINSKI G., PILC L., KASPRZYK A. and LESICKI A. (1983) The presence of insulin-like hormone in heads and midguts of Tenebrio molitor L. (Coleoptera) larvae. Comp. Biochem. Physiol., **74A**, 463-465.

TELLER J.K., PILC L. and ROSINSKI G. (1983) Insulin in insect tissues : Celerio euphorbiae. Abstract of the 19th Meet. Polish Biochem. Soc. Szczecin, Sept. 26-28.

VAN DER HORST D.J., HOUBEN N.M.D. and BEENAKERS A.M.T. (1980) Dynamics of energy substrates in the haemolymph of Locusta migratoria during flight, J. Insect Physiol., **26**, 441-448.

ZHANG Z., ZHUANG Q. and MEI M. (1983) Effects of some drugs on plasma and liver lipoprotein lipase activities and plasma cholesterol levels in rats. Yaoxue Xuebao, **18**, 468-471.

3 - Action de l'insuline endogène d'abeilles sur les relations glucido-lipidiques dans l'hémolymphe d'abeilles et interaction de la somatostatine. (M. BOUNIAS, R. MOREAU* et L. GOURDOUX*)

* Université de Bordeaux I - Laboratoire de Physiologie Animale : Métabolisme
33405 Talence cedex

L'étude présentée en 1984 a été acceptée dans Insect Biochemistry, avec les commentaires suivants du Professeur Lawrence I. Gilbert, Editeur : "It is a most interesting paper, and I am glad it will be in our journal".

A noter que les travaux du LBC sur la somatostatine constituent des "premières" absolues chez l'Insecte : or, parmi les "referees" des revues internationales spécialisées, figurent les noms de chercheurs réputés avec lesquels nous sommes souvent en concurrence directe. A plusieurs reprises, il a fallu combattre de féroces (et parfois manifestement déloyaux) barrages pour faire tomber les objections et obtenir l'acceptation des manuscrits. Certains "referees" acceptent leur défaite, devant les arguments adéquats, d'autres refusent le dialogue. Il est important de souligner que, dans tous les cas, les publications correspondantes exigent un **énorme temps de préparation.**

3 - 1

MARKED SET
PLEASE RETURN WITHIN
48 HOURS OF RECEIPT

MS 274

Insect Biochem. Vol. 00, No. 0, pp. 000–000, 1986
Printed in Great Britain. All rights reserved

0020-1790/86 $3.00+.00

Copyright © 1986 Pergamon Press Ltd

EFFECTS OF HONEYBEE INSULIN-IMMUNOREACTIVE PEPTIDE ON HAEMOLYMPH LIPID AND CARBOHYDRATE

INTERACTION OF VERTEBRATE SOMATOSTATIN

M. BOUNIAS,[1] R. MOREAU[2] and L. GOURDOUX[2]

[1]Laboratory of Biochemistry, Inra-Avignon, B.P. 91, F84140 Montfavet and [2]Laboratory of Animal Physiology, Metabolism, UA-CNRS 683, University of Bordeaux I, F33405 Talence Cedex, France

(*Received* 7 *November* 1984; *revised and accepted* 24 *September* 1985)

Abstract—The haemolymph lipid and carbohydrate concentrations were determined in emerging worker honeybees following injection of [I] saline, [II] a bee insulin-immunoreactive peptide (BIRP) and [III] BIRP + vertebrate somatostatin. BIRP promptly lowered trehalose, glucose, diacylglycerol and phospholipid concentrations, and increased the levels of fatty acid and triacylglycerol. It also induced a positive correlation between 1,2-diacylglycerol and short chain triacylglycerol, and completely reversed a negative correlation between long chain triacylglycerol and fatty acid, as well as a positive correlation between 1,3-diacylglycerol and steroid, both of the latter correlation appearing following treatment [I]. In all correlations except those between fatty acid, phospholipid and diacylglycerol, injection of vertebrates somatostatin together with BIRP partially neutralizes ~~injection of vertebrate somatostatin together with BIRP~~ the specific effects of BIRP injected alone, a result similar to the action of somatostatin in vertebrates. BIRP is an endogenous intestinal insulin-like peptide whose physiological activity may be modulated by somatostatin-like molecules.

INTRODUCTION

Hormonal factors have proved for many years to be active on glycemia (Steele, 1961) and lipemia (Mayer and Candy, 1969) of various insects, which reflects their ability to regulate carbohydrate and lipid metabolism, as reviewed by Steele (1980, 1981) and Beenakkers *et al.* (1981). Besides the action of apparently insect-specific factors, the injection into honeybees of the vertebrate hormones insulin, glucagon and adrenergics results in hypo- and hyperglycemic responses, suggesting that the insect does have receptors for analogous forms of the vertebrate hormones (Bounias and Pachéco, 1979a,b). Among these, insulin seems to be a very ancient peptide exhibiting a great stability through the evolution processes (Emdin and Falkmer, 1977): it now appears as widely distributed not only in vertebrates, but also in arthropods and worms (Leroith *et al.*, 1981). The presence of insulin-like activity was first reported by Dixit and Patel (1964) in the larval food of bees and then by Kramer *et al.* (1977) in the royal jelly of the honeybee. By contrast, Ischay *et al.* (1976) did not find insulin-like materials in the royal jelly but they determined significant amounts of insulin analog in the gut of the honeybees and other hymenopterans. Then, Maier *et al.* (1978) also found insulin immunoreactive substances in the bodies of honeybees. Recently, an insulin-immunoreactive preparation (IRP) has been extracted from honeybee intestine (Moreau *et al.*, 1981) and purified to electrophoretic and liquid chromatographic homogeneity in order to determine its amino acid sequence (Moreau *et al.*, unpublished). Since the hypoglycemic response of honeybees to vertebrate insulin has been shown to be susceptible to the action of vertebrate somatostatin (Bounias and Dubois, 1982), it seemed interesting to examine both the biochemical activity of the bee insulin-immunoreactive peptide (BIRP) and also its interaction with somatostatin, of which immunoreactive analogs have been found in the honeybee itself (Bounias and Dubois, 1980, 1982) and also in Orthoptera, Lepidoptera and Diptera (Roen-Schott *et al.*, 1978; Iwanaga *et al.*, 1981; El Salhy *et al.*, 1980, 1983).

Under the stress of physiological events, such as starvation or flight, involving mechanisms of hormonal regulation, interrelationships may appear between carbohydrate and lipid (Mwangi and Goldsworthy, 1977; Goldsworthy *et al.*, 1979; Van Der Horst *et al.*, 1980). A metabolic effector such as an insulin-like peptide may elicit variations in the haemolymph lipid concentration of insects correlated with glycemic changes. This has already been suggested to occur in vertebrates for fatty acid (Fried *et al.*, 1981), and phospholipid and steroid levels (Khaddzhiivanova *et al.*, 1981). In the present experiments, the variations of haemolymph lipid and carbohydrate titers were thus determined concomitantly, and their interrelationships were compared following the injection of saline, BIRP alone, and the mixture of BIRP and somatostatin.

MATERIALS AND METHODS

Insects

Emerging workerbees were collected on the brood combs from operculated alveoli in order to keep them free of any feeding-induced heterogeneity. During these experiments, 470 bees were used and their individual weights were 120.9 ± 0.8 mg, calculated from 55 groups of 5 to 10 bees. For each treatment, one homogeneous batch of bees coming from one single "spiral" turn of eggs-laying was used. Variations between batches coming from different combs do not affect the uniformity of the responses within each batch.

3 - 2

BIOCHIMIE. - *Une inter-relation entre glucose et acides gras, induite dans l'hémolymphe d'abeilles par l'injection d'insuline endospécifique et supprimée par la somatostatine de vertébrés.* Note(*) de **Michel Bounias, Robert Moreau et Lucienne Gourdoux,** présentée par Jean ROCHE.

L'injection à des abeilles ouvrières adultes de 0,5 µU d'une préparation purifiée d'insuline extraite d'abeilles, entraîne l'apparition d'une corrélation négative (ρ=-0,83) entre les concentrations de l'hémolymphe en glucose et en acides gras non estérifiés. L'injection simultanée de 10 ng de somatostatine linéaire de vertébrés supprime cette corrélation qui devient très faiblement positive, se rapprochant, ainsi, de celle consécutive à l'injection de sérum.

BIOCHEMISTRY. - An inter-relationships between glucose and fatty acid, induced in honeybees haemolymph by injection of endospecific insulin and suppressed by vertebrate somatostatin.

The injection to adult workerbees of 0.5 µU of a purified preparation of insulin extracted from bees, induces a negative correlation (ρ=-0.83) between the haemolymph levels of glucose and non esterified fatty acid. By simultaneous injection of a linear somatostatin purified from vertebrates, this correlation is suppressed and becomes weakly positive, i.e. similar to the one resulting from saline injection.

INTRODUCTION. - C'est en 1964 que Dixit et Patel [1] démontrèrent la présence, dans la gelée royale de l'abeille, d'un peptide présentant une activité physiologique insulinique (6 mU par g) ainsi qu'une mobilité électrophorétique analogue à celle de l'insuline de vertébrés. L'hypothèse de l'existence possible, chez l'abeille, de récepteurs sensibles à l'action de l'insuline et du glucagon de vertébrés fut confirmée en 1979 par Bounias et Pachéco [2] et l'isolement d'une molécule immunologiquement semblable à l'insuline de rat fut, enfin, réalisé par Moreau et coll., en 1981 [3]. Tout récemment, la présence d'insuline et de glucagon dans la tête de l'abeille a été également confirmée par une équipe allemande [4].

Les analogies ainsi apparues entre les mécanismes biochimiques régulateurs de l'insecte et ceux des vertébrés ont été renforcées par la découverte, dans l'intestin d'abeilles, d'une molécule immunologiquement semblable à la somatostatine des vertébrés [5]. Celle-ci, injectée aux abeilles, est, par ailleurs capable de neutraliser les actions hypoglycémiantes consécutives aussi bien à l'injection d'insuline

bovine [5] que d'une insuline extraite d'abeilles [6].

Sous certaines conditions physiologiques, telles que le jeûne, des relations fonctionnelles se manifestent entre composants glucidiques et lipidiques de l'hémolymphe de l'abeille [7] : il nous a donc paru intéressant d'examiner si des phénomènes de même nature pouvaient survenir sous l'action d'une insuline d'origine endospécifique, et s'ils seraient alors soumis également à l'influence de la somatostatine. L'une des interactions qui retient l'attention est celle relative au glucose et aux acides gras, qui constituent, chez certains insectes, des sources d'énergie sollicitées en alternance en fonction des nécessités physiologiques [8].

MATERIEL ET METHODES. - Les abeilles ouvrières naissantes (Apis mellifera, mellifera L.) sont prélevées, immédiatement avant leur émergence, dans les alvéoles encore operculés. Au cours des expérimentations, 280 abeilles d'un poids moyen individuel de 120,6 ± 2,5 mg ont été utilisées. L'insuline et la somatostatine ont été mises en solution dans le même sérum physiologique que précédemment [5] et injectées à raison de 0,5 µU d'équivalent en insuline et 10 ng de somatostatine dans 0,5 µl, soit la valeur de 1% de la volémie d'une abeille. Les prélèvements d'hémolymphe et les analyses chromatographiques ont été effectués comme précédemment [5] [7]. Les acides gras ont été dosés à partir de gammes étalons établies avec l'acide oléique, l'un des principaux constituants de la fraction des acides gras libres de l'abeille [9]. Chaque traitement porte sur 9 abeilles pour chacune des durées avant prélèvements, soit : 10 mn, 45 mn, 90 mn, 135 mn et 180 mn.

Les probabilités (P) associées aux calculs de corrélations et aux analyses de variance, ont été calculées d'après l'équation de distribution du " t " de Student.

RESULTATS. - Le tableau 11 présente les données relatives à la glucosémie. Par comparaison avec les valeurs moyennes mesurées entre 10 mn et 3 h après injections de sérum, les concentrations en glucose sont significativement abaissées de 28% par l'insuline, mais restent inchangées (à moins de 3% près) après injection du mélange d'insuline et de somatostatine. L'évolution de la glycémie en fonction du temps se traduit par une relation décroissante sous l'action de l'insuline (ρ=-0,662 ; P(ρ)=0,15 ; b=0,0034 ; σ_b=0,0019) qui contraste avec une augmentation très faiblement significative observée dans le cas du sérum (ρ=+0,49 ; P(ρ)=0,32) et non significative avec l'association d'insuline et de somatostatine (ρ=+0,26 ; P(ρ)=0,61).

L'analyse des données par la méthode des couples (K=5) permet de confirmer l'analogie de la réponse du mélange d'insuline et de somatostatine avec celle du sérum (P=0,73), tandis que l'action de l'insuline diffère de chacune des précédentes (respectivement : P=0,04 et P=0,12).

Le tableau 12 présente les résultats concernant les acides gras non estérifiés. Contrairement à ce qui a été observé pour le glucose, les concentrations moyennes varient peu avec l'insuline, et augmentent en présence de somatostatine. Les cinétiques de variations des concentrations en acides gras sont de tendance très faiblement positive dans le cas de l'injection de sérum (ρ=0,478 ; P(ρ)=0,34) ou d'insuline (ρ=0,450 ; P(ρ)=0,37) mais plus marquée en présence de somatostatine (ρ=0,666 ; P(ρ)=0,14). Analysé par la méthode des couples, le traitement par l'insuline ne diffère pas de l'action du sérum (P=0,53) mais s'écarte très significativement de celle du mélange d'insuline et de somatostatine (P=0,0002).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS. - Les données numériques présentées font apparaître une relation inverse entre les concentrations du glucose et celles des acides gras de l'hémolymphe, dans le cas de l'injection d'insuline. La corrélation, illustrée par la figure, est très significative : ρ=-0,835 (P=0,038) ; b=0,030 ; σ_b=0,017. En revanche, l'action de l'association d'insuline et de somatostatine, comme celle du sérum physiologique,ne font apparaître aucune relation (respectivement : ρ=0,41 ; P(ρ)=0,42 ; ρ=0,09 ; P(ρ)=0,87).

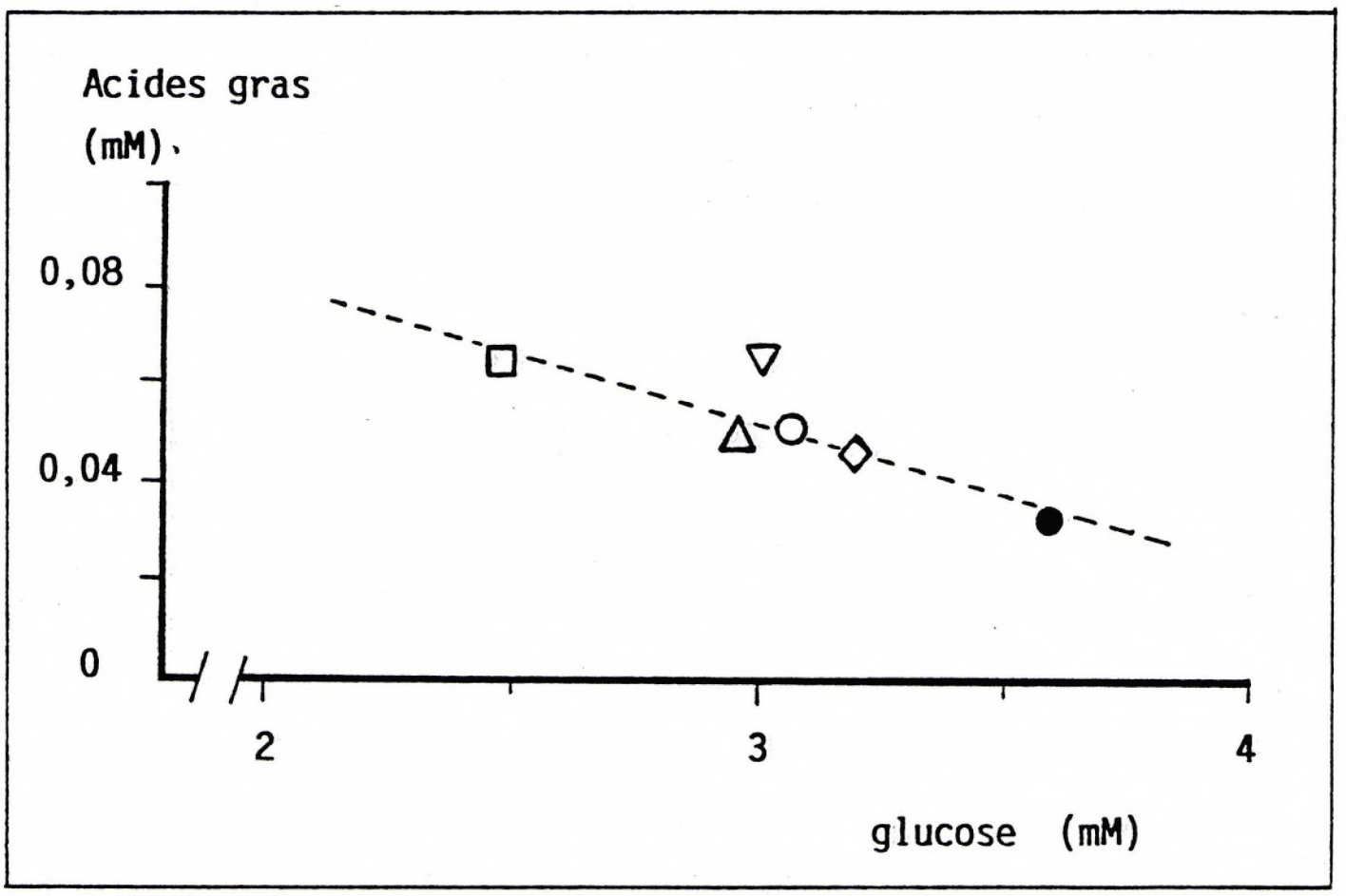


Fig. 11 - Relation fonctionnelle entre les concentrations de l'hémolymphe d'abeille en acides gras et en glucose après injection d'insuline d'origine endospécifique. Les symboles désignent les durées après injections. (●)=point initial ; (△)=10 mn ; (▽)=45 mn ; (o)=90 mn; (◇)=135 mn ; (□)=180 mn.

La pente de la relation fonctionnelle induite par l'insuline représente, en termes d'énergie métabolisable, 0,1 joule d'origine lipidique par joule d'origine glucidique : le rapport reste donc largement en faveur d'une dominante énergétique de type glucidique, chez l'abeille ; néanmoins, l'inter-relation ainsi mise en évidence montre que le métabolisme de l'insecte présente des analogies avec celui du rat [10] voire celui de l'homme, chez lequel des variations de sens inverse entre les concentrations en glucose et en acides gras ont été également décelées après injection de glucagon, c'est-à-dire, là encore, sous l'action d'un effecteur exerçant une "pression physiologique" [11].

Il est intéressant de constater que la somatostatine désorganise une telle réponse et rétablit l'absence de corrélation observée après une simple injection de sérum. Il est permis de se demander, d'autre part, si l'augmentation de concentration en acides gras obtenue en présence de somatostatine ne proviendrait pas d'un blocage sélectif d'agents hormonaux hypo-lipémiants.

Un dernier point important retient l'attention : de récents travaux ont apporté des résultats complémentaires, parfois aussi contradictoires [12] [13] sur les structures protéiques transporteuses de lipides chez les insectes : ces molécules étant constituées de sous-unités réunies en complexes, l'analyse des corrélations fonctionnelles entre composants lipidiques pourrait apporter des indications sur la formation éventuelle de différents types de complexes lipo-protéiques en fonction des nécessités physiologiques.

(*) Remise le

[1] P.K. DIXIT et N.G. PATEL, Nature, 202, 1964, p. 189-190

[2] M. BOUNIAS et H. PACHECO, Comptes Rendus, 289, 1979, p. 201-204

[3] R. MOREAU, C. RAOELISON et B. Ch. J. SUTTER, Comp. Biochem. Physiol., 69A, 1981, p. 79-83.

[4] V. MAIER, M. MEZGER, B. PFEIFLE et E.F. PFEIFER, Int. Congr. The Endocrine Society, Madrid, 1985, Abstr., 1 p.

[5] M. BOUNIAS et M.P. DUBOIS, Comptes Rendus, 294, 1982, p. 1029-1034.

[6] M. BOUNIAS, R. MOREAU et L. GOURDOUX, C.R. Soc. Biol., 178, 1984, p. 705-711.

[7] M. BOUNIAS, 1985, Comptes Rendus, sous presse.

[8] R.W. MWANGI et G.J. GOLDSWORTHY, J. Insect Physiol., 23, 1977, p. 1275-1280.

[9] F.A. ROBINSON et J.L. NATION, J. APic. Res., 9, 1970, p. 121-127

[10] S.K. FRIED, M. LAVAU et F.X. PI-SUNYER, J. Lipid Res., 22, 1981, p. 753-762.

[11] D. CUCINOTTA et S. CECCATO, G. Gerontol., 25, 1977, p. 1001-1012

[12] R.O. RYAN, J.O. SCHMIDT et J.H. LAW, Arch. Insect Biochem. Physiol., 1, 1984, p. 375-383.

[13] H. CHINO et R.G.H. DOWNER, Adv. Biophysics, 15, 1982, p. 67-92.

Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon
B.P. 91, F84140 Montfavet (France)
Laboratoire de Physiologie Animale :
Métabolisme, UA C N R S 683
Université de Bordeaux
F33405 Talence Cédex (France)

Tableau 11- Variations de la glucosémie de l'abeille après injection de sérum, d'insuline pure ou du mélange d'insuline et de somatostatine. Les moyennes ($\bar{x}$) et les écarts-types (s_x) exprimés en mM, sont calculés à partir de (N) mesures.

Traitements :	Sérum $\bar{x}$ (N) s_x	Insuline $\bar{x}$ (N) s_x	Insuline + Somatosatine $\bar{x}$ (N) s_x
Valeurs initiales	3,30(3)0,33	3,60(3)0,30	3,30(6)0,60
10 mn	3,88(3)0,67	2,96(4)0,78	4,41(3)0,40
45 mn	3,37(3)0,67	3,01(6)2,58	4,08(3)0,28
90 mn	2,44(3)0,44	3,06(4)0,54	2,96(3)0,08
135 mn	6,45(3)1,70	3,19(6)0,61	5,82(3)0,40
180 mn	4,38(3)1,98	2,47(4)0,23	3,79(3)0,25
Moyenne après traitement	4,10(5)1,34	2,94(5)0,25	4,21(5)0,94
Comparaison avec l'action du sérum :		P<0,05	non significatif

Tableau 12 - Variations de la concentration en acides gras (mM) dans l'hémolymphe de l'abeille, après injection de sérum, d'insuline pure ou du mélange d'insuline et de somatostatine. Les moyennes ($\bar{x}$) et les écarts-types (s_x) exprimés en mM, sont calculés à partir de (N) mesures.

Traitements :	Sérum $\bar{x}$ (N) s_x	Insuline $\bar{x}$ (N) s_x	Insuline + Somatostatine $\bar{x}$ (N) s_x
Valeurs initiales	0,060(4)0,016	0,032(2)0,013	0,081(3)0,050
10 mn	0,059(4)0,005	0,049(2)0,020	0,129(2)0,045
45 mn	0,061(4)0,015	0,067(4)0,015	0,119(2)0,041
90 mn	0,033(4)0,007	0,050(2)0,019	0,104(2)0,036
135 mn	0,040(4)0,016	0,045(4)0,033	0,125(2)0,044
180 mn	0,134(4)0,068	0,064(2)0,024	0,150(2)0,051
Moyenne après traitement	0,065(4)0,036	0,055(5)0,009	0,125(5)0,015
Comparaison avec l'action du sérum :		non significatif	P<0,05

4 - Analogie d'action de deux effecteurs hyperglycémiants : l'AMPc et le glucagon injectés chez l'abeille in vivo. (M. BOUNIAS).

INTRODUCTION. - La présence d'analogues immunologiques du glucagon dans le corps de l'Abeille et l'activité hyperglycémiante du glucagon de Porc injecté chez ce même Insecte in vivo ont été démontrées presque simultanément [1][2][3]. Or, chez les Vertébrés, la libération de glucagon agit par l'intermédiaire d'une décharge d'AMP cyclique [4] considéré , alors, comme "second messager". D'autre part, la présence de protéines kinases activables par l'AMP cyclique a été démontrée chez le criquet [5] et chez la mouche des fruits [6], ce qui suggère l'hypothèse que l'AMP cyclique pourrait être, également chez l'Insecte, le médiateur d'un système glycogénolytique analogue à celui des vertébrés. Il nous a donc paru intéressant d'étudier, d'une part, les effets de l'injection d'AMP cyclique sur la glycémie de l'Abeille in vivo, et de les comparer, d'autre part, à ceux provenant de l'action de l'injection de glucagon de porc, compte tenu de ce que la purification d'une quantité de glucagon endogène d'Abeille suffisante pour permettre l'analyse n'a pas encore été achevée.

METHODES - Les abeilles (Apis, mellifera, mellifera L.) ont été prélevées au stade d'adultes ouvrières naissantes, dans les alvéoles encore operculés. Au cours de la série d'expériences décrite, 200 abeilles d'un poids moyen individuel de 122,6 ± 1,9 mg ont été utilisées. Les injections ont été opérées comme précédemment [3]. L'AMP cyclique (AMPc) a été administré sous forme de dibutyrate à raison de 2 nmoles par abeilles, et le glucagon de Porc à raison de 400 ng soit 0,1 nmole par individu, l'un et l'autre dans un volume de 0,5 µl de soluté physiologique composé comme suit : KCl 20 mM + NaCl 5 mM + HCl, QSP pH=6,8. L'hémolymphe est recueillie au bout de 10 mn puis à intervalles de 45 mn pendant une période de 3 heures, au cours de laquelle les abeilles sont maintenues à 21 ± 1°C à l'obscurité afin d'éviter toutes modifications de la glycémie pouvant résulter de leur agitation à la lumière. Les glucides sont analysés selon les techniques nano-chromatographiques décrites ailleurs [7][8][9]. Des lots de 9 abeilles sont utilisées pour chaque durée d'incubation après injection de chacun des effecteurs. Les probabilités de signification attachées aux comparaisons de moyennes et aux valeurs des coefficients de corrélations sont calculées d'après l'équation de "t" de student.

RESULTATS. - La figure 12 présente les variations de la tréhalosémie et de la glucosémie obtenues après injections d'AMPc, ainsi que les valeurs témoins résultant de l'injection de soluté physiologique. Trois séries d'expériences témoins ont été réalisées, avant, pendant, et après les injections d'hormones. L'AMP cyclique provoque une élévation de la tréhalosémie immédiatement après injections : les différences au temps (To + 10 mn) sont déjà significatives relativement à la tréhalosémie initiale (P=0,04) quoiqu'elles ne le soient pas encore relativement à la valeur mesurée 10 mn après injection de soluté physiologique (P=0,1). Le pic observé à 45 mn (+93%) (P< 0,0002) est suivi d'un retour à la normale (P > 0,09) au bout de 90 mn, où, cependant, les valeurs mesurées restent supérieures à celles des témoins (P=0,001). Un second pic se manifeste au bout de 2h15 et reste significatif 3h après injections (P < 0,004). Son amplitude (+76%) est toutefois significativement inférieure à celle du précédent (P=0,014).

La glucosémie n'augmente qu'à partir de 45 mn (+115%) (P < 0,01), puis passe, comme la tréhalosémie, par un retour vers la valeur initiale à 90 mn (P=0,08), tout en restant supérieure à celle des témoins correspondants (P=0,01). Un second pic (+120%) est également observé au bout de 2h15 (P=0,008) : il convient, toutefois d'observer qu'une telle remontée, entre 90 mn et 135 mn, se produit aussi bien sous l'action de l'AMPc qu'après injection de soluté physiologique, ce qui peut apparaître comme le signe d'un mécanisme commun. La différence observée à 135 mn entre les lots ayant reçu de l'AMPc et les témoins n'est d'ailleurs, plus significative (P=0,12), et cette convergence aboutit à des valeurs numériques pratiquement identiques 3h après injections.

La figure 13 présente les variations de la tréhalosémie et de la glucosémie après injection de glucagon. Comme dans le cas de l'action de l'AMPc, deux pics successifs apparaissent respectivement à 45 mn et 135 mn. En ce qui concerne le tréhalose, cependant, l'amplitude du premier (+24%) est, au contraire, moins importante (P=0,06) que celle du second (+65%) ce qui confirme nos résultats antérieurs [2]. L'augmentation de la tréhalosémie est déjà significative à 10 mn par comparaison avec la valeur initiale (P=0,04) mais elle ne l'est pas relativement à celle des témoins correspondants (P=0,25) à laquelle elle ne devient supérieure qu'à 45 mn (P=0,001). Le pic du tréhalose observé à 2h15 est significatif à la fois vis à vis de la teneur initiale (P=0,014) et de celle des témoins pris au même temps (P=0,034). Un retour vers la normale se produit, dans les deux cas, après 3h.

L'augmentation de la glucosémie n'est significative, aux temps 10 mn (+45%), 45 mn (+83%) et 2h15 (+82%) que relativement aux valeurs initiales (P=0,09 ; P=0,075 et P=0,010 respectivement) bien qu'elle le soit à 90 mn par rapport aux témoins (P=0,002), ceci en raison d'une diminution des écarts-types observés. En revanche, les variations de la glycémie consécutives à l'injection du glucagon sont en corrélation plus étroite avec celles dues à l'AMPc dans le cas du glucose (ρ=0,812 ; $P_{(\rho)}$=0,05) que dans celui du tréhalose (ρ=0,50 ; $P_{(\rho)}$=0,31) : ceci provient de l'inversion, chez ce dernier, des proportions respectives des pics à 45 mn et 135 mn sous l'action des deux effecteurs (fig. 1 et 2).

Enfin, une certaine analogie entre l'action des effecteurs hormonaux et celle de l'injection de soluté physiologique apparaît de nouveau à l'observation des graphiques (fig. 11 et 12). Toutefois, cette remarque n'est étayée ni dans le cas du glucagon, ni dans celui de l'AMPc par

les calculs de corrélations, dont aucun ne donne de coefficient significatif.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS. - Si la présence, chez les Insectes, d'hormones peptidiques hyperglycémiantes a été suggérée depuis près de 20 ans [10], ce n'est que bien plus tard que la présence d'analogues radio-immunologiques du glucagon a été signalée, d'abord chez Manduca sexta [11]. La mise en évidence d'une sensibilité de certains sites récepteurs de l'Abeille à l'action du glucagon de vertébrés est étayée par l'isolement chez cet Hyménoptère, d'un peptide hyperglycémiant [12] et par la récente description de la présence, dans son cerveau, d'analogues immunologiques du glucagon [13].

Le mode d'action du glucagon paraît différer de celui des adrénergiques [14] en ce qu'il manifeste son maximum d'intensité au bout d'un temps plus long. Or, il a été montré, que, chez les Vertébrés, un inhibiteur des récepteurs β adrénergiques bloque l'action de l'adénylate cyclase [15], tandis que, chez l'Abeille, un autre β-bloquant, le propranolol, neutralise l'hyperglycémie induite par la noradrénaline injectée in vivo [16]. Il est donc particulièrement intéressant de constater, maintenant, que l'action chez l'Abeille du glucagon de Vertébrés provoque des effets très comparables à ceux résultant de l'injection d'AMPc. La réponse est plus intense à plus court terme dans ce dernier cas, ce qui serait compatible avec l'intervention de l'AMPc comme second messager : son administration provoquerait, en effet, une réponse plus directe que celle du glucagon de porc, lequel, par ailleurs, peut présenter certaines différences d'ordre phylogénique avec le glucagon endogène d'Abeille. Nous nous proposons donc de décrire, dans les étapes suivantes de nos travaux, d'une part la comparaison des effets respectifs du glucagon endogène et de celui des mammifères, et d'autre part, la confrontation de l'action de différents types d'inhibiteurs

sur les manifestations hyperglycémiques respectivement provoquées par le glucagon, l'AMPc et la noradrénaline, chez l'Abeille. Il nous est permis d'espérer apporter ainsi quelques arguments sur la question épineuse de la comparaison des rôles respectifs des effecteurs hyperglycémiants peptidergiques et adrénergiques.

Etant données les relations précédemment observées entre la glycémie des Abeilles et leur productivité [17], de telles connaissances paraissent indispensables comme préalable à l'étude du mode d'action de certaines spécialités agrochimiques dont les effets "non intentionnels", chez l'Abeille, constituent, depuis quelques années, un grave sujet d'inquiétude, aussi bien parmi les agriculteurs que chez les apiculteurs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] V. MAIER, G. WITZNICK, R. KELLER et E.F. PFEIFFER Acta Endocrinol. **87**, Suppl. 215, 1978, p. 69-70.

[2] M. BOUNIAS, C.R. Ann. Lab. Biochimie, **7**, 1978, p. 41-43.

[3] M. BOUNIAS et H. PACHECO, Comptes Rendus, **201D**, 201-204.

[4] J.H. EXTON, A.D. CHERRINGTON, N.J. HUTSON et F.D. ASSIMACOPOULOS-JEANNET, Glucagon : Its Role Physiol. Clin. Med. P.F. FOA Editeur, Springer N.Y., p. 321-347.

[5] W.J.A. VAN MARREWIJK, A.T.M. VAN DEN BROECK et A.M.T. BEENAKKERS, Insect Biochem., **10**, 1980, p. 675-679.

[6] J.L. GARCIA, A. HARO et A.M. MUNICIO, Arch. Biochem. Biophys., **220**, 1983, p. 509-518.

[7] M. BOUNIAS, Analusis, **4**, 1976, p. 87-93.

[8] M. BOUNIAS, Analyt. Biochem., **106**, 1980, p. 291-295.

[9] M. BOUNIAS, L'Analyse Biochimique quantitative par Nanochromatographie en couche mince, Masson, 1983, p. 205.

[10] A.W. WIENS et L.I. GILBERT, J. Insect Physiol., **13**, 1967, p. 779-794.

[11] H.S. TAGER, J. MARKESE, R.D. SPIERS et K.J. KRAMER, Nature (London), **254**, 1975, p. 707-708.

[12] M.D. VAN NORSTRAND, J.B. CARLSEN, L. JOSEFSSON et W.S. HERMAN, Gen. Comp. Endocrinol., **42**, 1980, p. 526-533.

[13] V. MAIER, D. GRUBBE, R. STEINER, A. GREISCHEL et D. PFEIFFER, The New Frontier, Abstr. Symp. Int. "Brain-Gut Axis", Florence, p. 19.

[14] M. BOUNIAS et H. PACHECO, Comptes Rendus, **289D**, 1979, p. 33-36.

[15] J.W. KUSIAK et J. PITHA, Biochemical Pharmacol., **33**, 1984, p. 483-485.

[16] M. BOUNIAS, C.R. Soc. Biol., **179**, 1985, p. 218-223.

[17] M. BOUNIAS, J. APic. Res., **20**, 1981, p. 215-220.

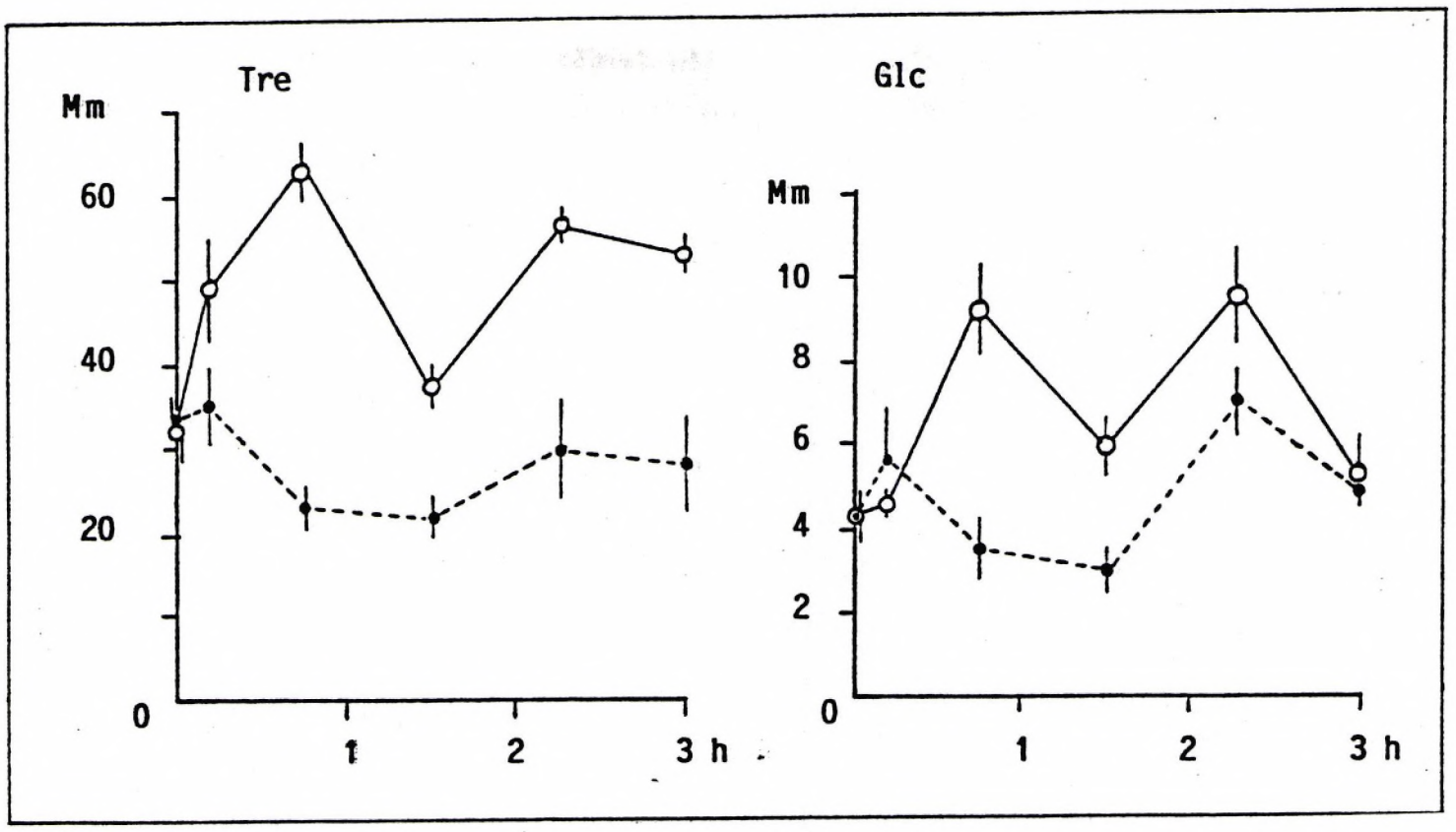


Fig. 12 - Variations de la tréhalosémie (Tre) et de la glucosémie (Glc) d'Abeilles ouvrières naissantes après injection de dibutyrate d'AMP cyclique (— o —) ou de soluté physiologique (--- o ---). Les moyennes et les écarts-types (traits verticaux) ont été calculés d'après N=3 mesures.

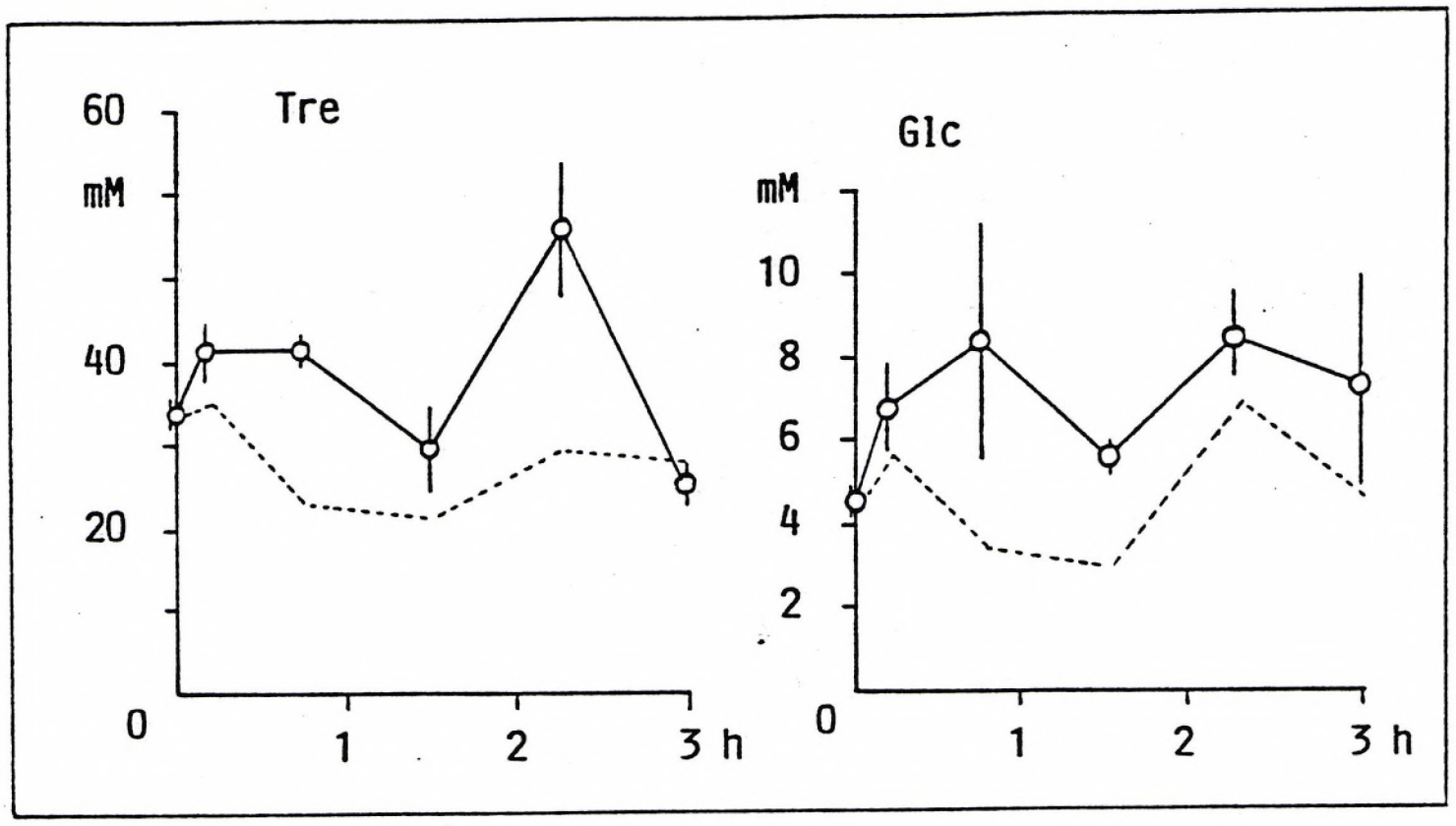


Fig. 13 - Variations de la tréhalosémie (Tre) et de la glucosémie (Glc) d'Abeilles ouvrières naissantes après injection de glucagon de Porc (— o —) ou de soluté physiologique (--- ---). Les moyennes et les écarts-types (traits verticaux) ont été calculés d'après N=3 mesures.

5 - Comparaison des classes de lipides à divers stades du développement de l'abeille (M. BOUNIAS, M. DEBEVEC* et D.S. POPESKOVIĆ*)

* Université de Belgrade, Département de Biologie, Fac. Med. Vet., P.O. Box 370, 11000 Beograd, Jugoslavija

Ce travail constitue une introduction aux recherches de traumatologie et thanatologie de l'Abeille entreprises à partir de 1980 en collaboration avec l'équipe du Professeur Popeskovic, (Chef du Dépt., titulaire de la chaire de Biologie et Membre de l'Académie des Sciences de New York) dans le cadre d'une demande formulée par l'Université de Belgrade lors d'accords gouvernementaux. Mme Debevec, M. Sc. avait effectué un stage de formation au laboratoire de Biochimie. La collaboration se poursuit dans des conditions difficiles, en raison du manque de moyens auquel se heurtent les partenaires yougoslaves.

Le texte suivant est rédigé en anglais, du fait des difficultés des partenaires à s'exprimer dans leurs langues réciproques.

INTRODUCTION

One of the first works dealing with honeybees lipids was done by STRAUSS in 1911 [1], who estimated the total fats content at 18% of the dry weight of the whole body of workers. Lipid variations during nymphosis have been reported, by MELAMPY et al. (1940) [2], and an extensive work on the comparative variations of lipid concentrations in developing queen and workers has been reported by TSAO and SHUEL (1973) [3][4]. However, these data were limited to larvae, and crude fats were estimated by a weighting methods.

Quite recently, VAN DER VORST et al. (1983) [5] have thoroughly studied the variations of the fatty acid and sterol composition of larvae, while SVOBODA et al. extended to honeybees their interesting work on sterol metabolism in insects [6].

In front of the increasing severity of the risks of damage from agrochemicals to foraging bees, as emphasized by several international reports [7][8], and because of the particular effects of different classes of pesticides to insect lipids [9][10] including bees [11], it seemed interesting to start a series of studies on the biochemical semiology of different types of traumatisms to bees [12]. For these reasons, we first have attempted, in the present work, to determine the evolution of the comparative levels of various lipid classes during the development of worker honeybees, from last instar larvae to adults.

MATERIAL AND METHODS

Honeybees (Apis mellifera, mellifera L.) were taken from brood combs at the following stages as designated by BOUNIAS [13][14] : 5th instar larvae (L_5), mature larvae (L_M), white eyed nymphs (No), brown eyed nymphs (N_{2-3}), brown body, dark-violet eyed nymphs (N_5), emerging

adults (Ao) and foraging adults (Ab). The duration of each stage and average weights of individuals have been previously reported [14]. The haemolymph was punctured by means of microsyringes. then added the same volume of chloroform. stirred to emulsion, then centrifuged (5 mn at 5000 g) and the lower phases separated and kept under refrigeration (0°C).

Samples were spotted on TLC precoated sheets of silicagel (Merck ® ref. 5748). Each spot was the equivalent of 2 to 5 µl of haemolymph. Chromatograms were developped as previously described [15][16] and the spots revealed by perchloric acid charring were quantitated using a dual-beam densitometer (Vernon PHI-5).

Each lipid class was determined from a particular calibration curve using the following standards : phospholipid class (PL)=an equimolar mixture of phosphatidyl inositol and dihydrosphingosin (10 mg per ml each) ; free sterol (St) : cholesterol ; esterified sterol (ESt) : cholesteryle linoleate ; fatty acid (FA) : oleic acid ; mono. di and triacylglycerol : the oleic series. These standards are fairly representative of the major fatty acid classes of L_5 larvae [5]. The honeybees sterol are mainly represented by other forms from Plant origin. [5] but they show similar calibration characteristics as cholesterol [16].

Means and standard deviations were calculated from 3 determinations. and comparisons were based on probabilities calculated from the equation of the student's "t" distribution.

RESULTS

Table 13 (or fig. 14) shows the variations of phospholipid and free and esterified steroid. The latter class shows a peak at the No

stage whereas the former two reach their maximum at the N_{2-3} stage. For either phospholipid or free sterol, L_5 larvae show similar values as emerging and foraging bees. whereas mature larvae (L_M) rather belong to the group of nymphal values.

Table 14 (or fig. 15) shows the variations of fatty acid, monoacylglycerol and diacylglycerol. The former show 2 peaks at L_M and L_5, i.e. at intermediate stages between larvae and nymphs, and between nymphs and adults, respectively, then, they reach a maximum value at the foraging stage. The monoacylglycerol fraction exhibits a similar shape of variations as phospholipids whereas both 1-2 and 1-3 diacylglycerol show a later peaking, at the N_5 stage.

Four triacylglycerol fractions were observed in the course of these experiments. They have been designated as TG 1 to TG 4 in the order of increasing mobilities (i.e. of decreasing polarities). as illustrated on fig. 1 (or fig. 3) where they correspond to fractions 7 to 10. Table 3 (or fig. 4) shows that the major fraction, TG 4 (with chain lenghts > C18) rapidly increases from L_M to a peak at the first nymphal stage (just like esterified sterol) and then decreases to very weak values in adults. Fractions 2 and 3 also peak at the same time. whereas the fraction TG 1, of lower mobility, exhibits a maximum value at slightly later stages (N_{2-3}) i.e. at the same time as monoacylglycerol, phospholipid and free steroid.

DISCUSSION

One of the most striking result is perhaps that free fatty acid is the only lipid class that does not reach a maximum value during nymphosis. but at hte stage of foraging adult. This observation might be related to the data obtained by GOLDSWORTHY et al.

(1979) [17], showing that lipids are preferably supplied as a source of energy during the periods of cruising speed flight. The presence of high amounts of circulating fatty acids in foraging bees might thus similarly reflect their important metabolic utilization linked to the flight activity which does not occur at earlier adult stages. In the course of these experiments, we have not been able to determine the lipid composition of wintering bees. However, according to TOMASZEWSKA and CZERNICHOWSKA, 1976 [18], a decrease of lipid content can be again correlated with a decrease of flight activity. No long-chain fatty acid were detected in noticeable amounts in these batches of bees, as previously found in adults honeybees during other experiments [11] [19] and in other Insect species [20].

Phospholipid and free steroid as well as monoacylglycerol and short-chains triacylglycerol reach maximum values at the middle of nymphal development. These compounds might thus be connected to similar transport apoproteins, such as the lipophorins recently described by ROBBS et al. in larvae [21]. Then, the data are in agreement with the results of EREMIYA, 1984, [22] showing maximum values of fats and proteins at nymphal stages, followed by a further peak of proteins in adults, which might play the role of separate fatty acid carrier. All the lipid carrier proteins recently described, including arylphorins [23] have very high molecular weights, and thus are likely contributing to protein classes A, B and C described 10 years ago by not denaturating methods [23][24][25].

The minimum concentrations of free fatty acid occur at the same time as phospholipid, monoacylglycerol and TG 1 reach their top levels, which might indicate a mobilization by esterification processes.

It is interesting to note that 1-3 diacylglycerol are more concentrated than the 1-2 form. except in emerging adults as already reported [19]. This rises the question of the involved stereospecific forms. most likely in the "trans" configuration of the carbon 2 of the glycerol moiety relatively to carbons 1 and 3. The maximum levels of these 2 groups. which are also carried in insects by high molecular weight proteins composed of several subunits [26] do not coincide with those of the major form of triacylglycerol, which are 100 times as much concentrated as diacylglycerol. This suggests that important differences should appear in lipid substrates requirements from the prenymphal to the last nymphal stages.

A last point should now be emphasized : the queen lays eggs on each face of the brood combs according to a spiral path. Accordingly, all bees kept at the same developmental stage from such positions in the hive can be assumed to come from one single turn of oviposition and thus be homogeneous. By contrast, other baches of bees coming from other combs come from other turns of oviposition and because of the accumulated differences in the physiological state of the queen. in the rearing action of young workers. in the possible variations in the nature of the substrates available at each period, etc.. there may occur foutuitous differences in the initial levels of biochemical parameters. However, the genetic potential remains constant and the relative effects of treatments, such as pharmacological assays, should nevertheless be reproducible.

It can then be expected that a number of stress-induced metabolic deviations may result in changes pf the pattern of lipid concentrations, not only as short term effects during several hours after treatment, but also as repercussions on the successive developmental stages. This is the aim of further steps of our works.

REFERENCES

1. STRAUSS, J., 1911. Die chemische zusammensetzung der arbeitsbienen und dröhnen während ihren verschiedenen entwick lungs-stadien. ZZ. Biol., **56**, 347-397

2. MELAMPY, R.M., WILLIS, E.R. & MAC GREGOR, S.E., 1940. Biochemical aspects of the differenciation of the female honeybee. Physiol. Zool., **12**. 283-293

3. TSAO, W., 1973. Effect of dietary sugars on tissue lipid and carbohydrate in developing honeybee larvae. Can. J. Zool., **51**. 1101-1108

4. TSAO, W. & SHUEL, R.W., 1973. Studies in the mode of action of royal jelly in honeybee development. IX. The carbohydrates and lipids in the haemolymph and the fat body of developing larvaes. Can. J. Zool., **51**, 1139-1148

5. VAN DER VORST, E., MATTYS, J., JACOBS, F.J. & RYCKE, P.H., 1983. Fatty acid and sterol composition during larval development in the honeybee. J. Api. Res., **22**(1), 3-8

6. SVOBODA, J.A., HERBERT, E.W., Jr. & THOMPSON, M.J., 1983. Definitive evidence for lack of phytosterol dealkylation in honeybees. Experientia, **39**(10), 1120-1121

7. NRC Associate committee on scientific criteria for environmental quality. 1981. Pesticide pollinator interactions - N.R.C.C. n°18471. 194 pp.

8. CRANE, E. & WALKER, P., 1983. The impact of pest management on bees and pollination. International Bee Research Association, printed by the Cambrian News (Aberystwyth) Ltd., 199 pp.

9. ORR, G.L. & DOWNER, R.G.H., 1982. Effect of Lindane (γ-Hexachlorocyclohexane) on carbohydrate and lipid reserves in the American cockroach. Periplaneta americana L.. Pestic. Biochem. Physiol., 17. 89.

10. SAMARANAYAKA, M., 1974. Insecticide-induced release of hyperglycaemic and adipokinetic hormones of Schistocerca gregaria. Gen. Comp. Endocrinol., 24. 474.

11. BOUNIAS, M., DUJIN, N. & POPESKOVIĆ, D., 1984. Effect of sublethal doses of a synthetic pyrethroid : deltamethrin, on the glycemia, the lipemia and the gut alk. phosphatases of the honeybees. Pestic. Biochem. Physiol., on press.

12. BOUNIAS, M., DEBEVEC, M., ARSENUEVIC, M. & POPESKOVIĆ, D., 1981. Lipidni Spektar Hemolimfe larvi dveju rasa medonosne pcele (Apis mellifica, mellifica, et A.M. arnica) Izlozenith raslicitom termicom opterecenju. C.R. Soc. Entomol. Serbe : 3e congr. scientif. ann., 28-29 Mai 1981, 8 p.

13. BOUNIAS, M., 1976. Paramètres cinétiques de l'activité α-glucosidasique de l'hémolymphe au cours du développement de l'Abeille noire. Apidologie. 7(3). 263-275.

14. BOUNIAS, M., 1978. Intra glycemic relations occuring during the development of honeybees workers Apis mellifica, mellifica. L. Comp. Biochem. Physiol., 61A. 13-18

15. BOUNIAS, M., 1981. Micro-analyse quantitative par chromatographie sur couche mince de quelques métabolites de l'hémolymphe d'Insectes. III - Les lipides. Analusis. 10(1). 31-35

16. BOUNIAS, M., 1982. L'analyse biochimique quantitative par nano chromatographie en couche mince .... Masson éditeur, série "chimie". 204 p., ISBN 2-225-78914-2

17. GOLDSWORTHY, G.J., JUTSUM, A.R. & ROBINSON, N.L.. 1979. Substrate utilization and flight speed during tethered flight in the locust. J. Insect Physiol., 25. 183-185

18. TOMASZEWSKA, B. & CZERNICHOWSKA, A., 1976. Study of the level of glucose and total lipids in the hemolymph of wintering honeybees. Pszczelnicze Zesz. Nauk., 20. 203-8

19. BOUNIAS, M., 1983. Distribution des classes de lipides dans différentes parties du corps de l'Abeille (Apis mellifera mellifera L.). C.R. Soc. Biol., 177(1), 14-21

20. STANLEY-SAMUELSON, D.W. & DADD, R.H., 1983. Long-chain polyunsaturated fatty acids : patterns of occurrence in insects. Insect Biochem., 13(5), 549-558

21. ROBBS, S.L., RYAN, R.O., SCHMIDT, J.O., KEIM, P.S. & LAW, J.H., 1985. Lipophorin of the larval honeybee, Apis mellifera L. J. Lipid Res., 26(2), 241-247

22. EREMIYA, N.G., 1984. Water, fat and protein content of the bee in spring. Dostizh. Nauki Zhivotnovod (Ed. by Fedoryaka, V.P., Shtiintsa: kishinev, USSR), 73-81

23. RYAN, R.O., SCHMIDT, J.O. & LAW, J.H., 1984. Arylphorin from the haemolymph of the larval honeybee, Apis mellifera. Insect Biochem. 14(5), 515-520

24. BOUNIAS, M., 1975. Les protéines de l'hémolymphe chez l'Abeille Apis mellifica, mellifica L. I - Larves, nymphes et naissantes. Apidologie, 6(3), 207-218

25. BOUNIAS, M., 1975. Les protéines de l'hémolymphe chez l'Abeille Apis mellifica, mellifica, L. II - Adultes butineuses et hivernantes. Apidologie, 6(3), 219-232

26. CHINO, H., KATASE, H. & DOWNER, R.G.H., 1981. Diacylglycerol-carrying lipoprotein of hemolymph of the American cockroach : purification characterization and function. J. Lipid Res., 22(1), 7-15

Tableau 13 - Variations des concentrations (mM) de phospholipides, stéroïdes libres et estérifiés dans l'hémolymphe d'abeilles à différents stades de leur développement. Moyennes et écarts-types sont donnés pour N=3 déterminations.

Stages	Phospholipid	Steroid	Esterified steroid
L_5	2.55(0.37)^a	0.55(0.30)^a	0.07(0.02)^a
L_M	4.58(0.16)^b	1.83(0.30)^b	0.19(0.16)
No	5.15(0.10)^b	2.14(0.30)^b	0.80(0.45)^b
N_{2-3}	6.75(0.24)^c	2.94(0.45)^b	0.56(0.33)^b
N_5	3.79(0.15)	1.82(0.27)^b	0.30(0.19)
Ao	2.56(0.51)^a	0.34(0.01)^a	0.035(0.007)^a
Ab	2.82(0.44)^a	0.75(0.12)^a	0.04(0.02)^a

a. b. c. groups without interval significance but different from one another at $P < 0.05$

Tableau 14 - Variations des concentrations (mM) des acides gras, monoglycérides et diglycérides 1-2 et 1-3 dans l'hémolymphe d'abeilles à différents stade du développement. Les moyennes et les écarts-types sont donnés pour N=3 déterminations.

Stages	fatty acid	monoacyl--glycerol	1-2 diacyl--glycerol	1-3 diacyl--glycerol
L_5	0.61(0.26)^d	Tr ^{a}	Tr ^{a}	0.064(0.011)^a
L_M	1.03(0.04)^d	0.14(0.04)*	0.18(0.05)*	0.22 (0.03)^a
No	0.84(0.12)^d	0.21(0.06)*	0.17(0.05)*	0.29 (0.03)^a
N_{2-3}	0.62(0.10)^a	0.38(0.09)^b	0.30(0.09)*	0.74 (0.12)
N_5	1.13(0.13)^b	0.14(0.05)*	0.48(0.13)^c	1.06 (0.13)^b
Ao	0.82(0.11)^d	0.09(0.03)^a	0.07(0.02)^b	0.035(0.025)^a
Ab	4.77(0.69)^c	Tr	0.24(0.07)*	0.23 (0.10)^a

(Tr : traces only)
a. b. c. d : significantly different from one another at P=0.05
* : not significantly different from one another

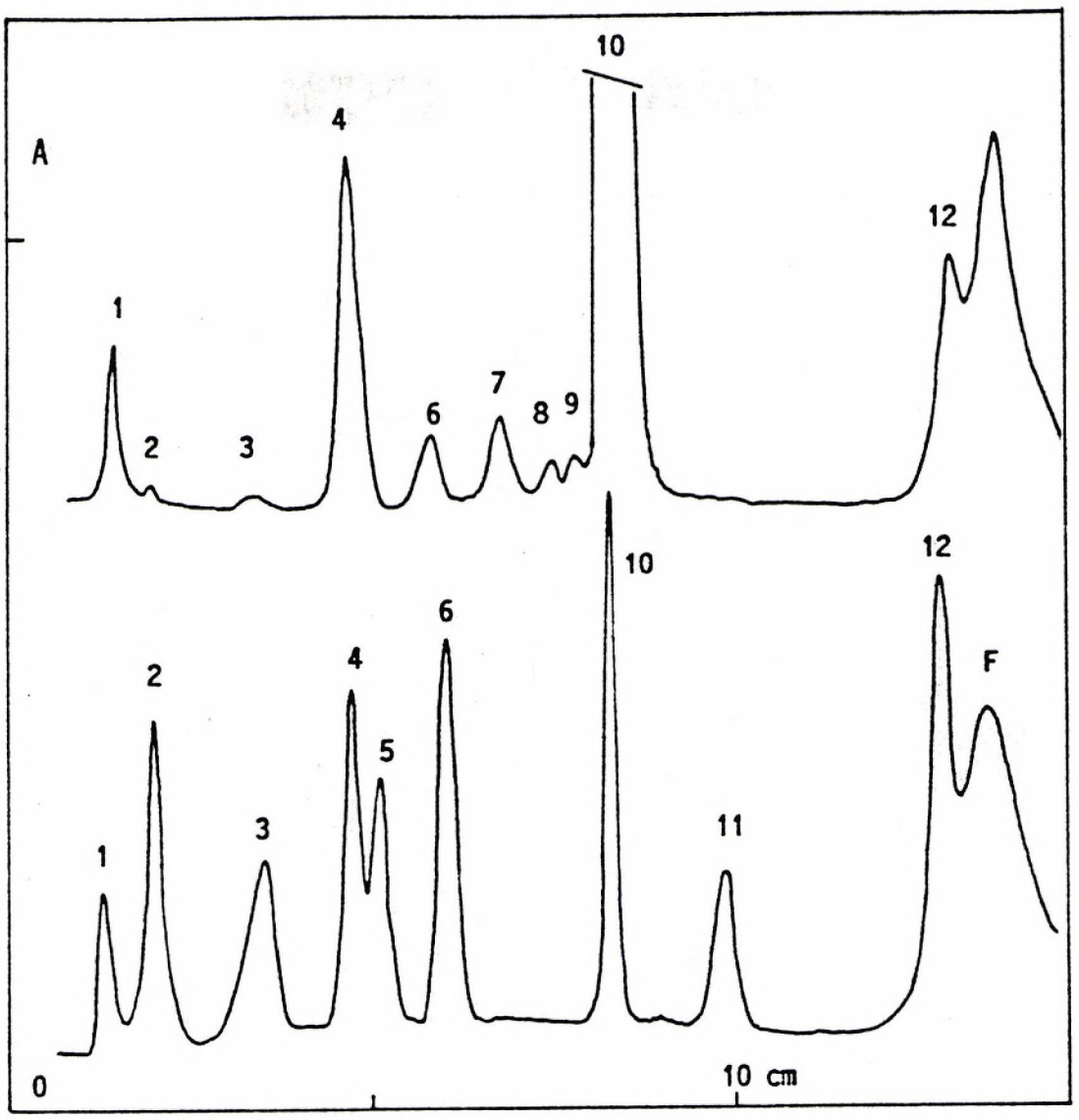


Fig. 14 - Chromatogramme des lipides dans l'hémolymphe de nymphes d'Abeilles

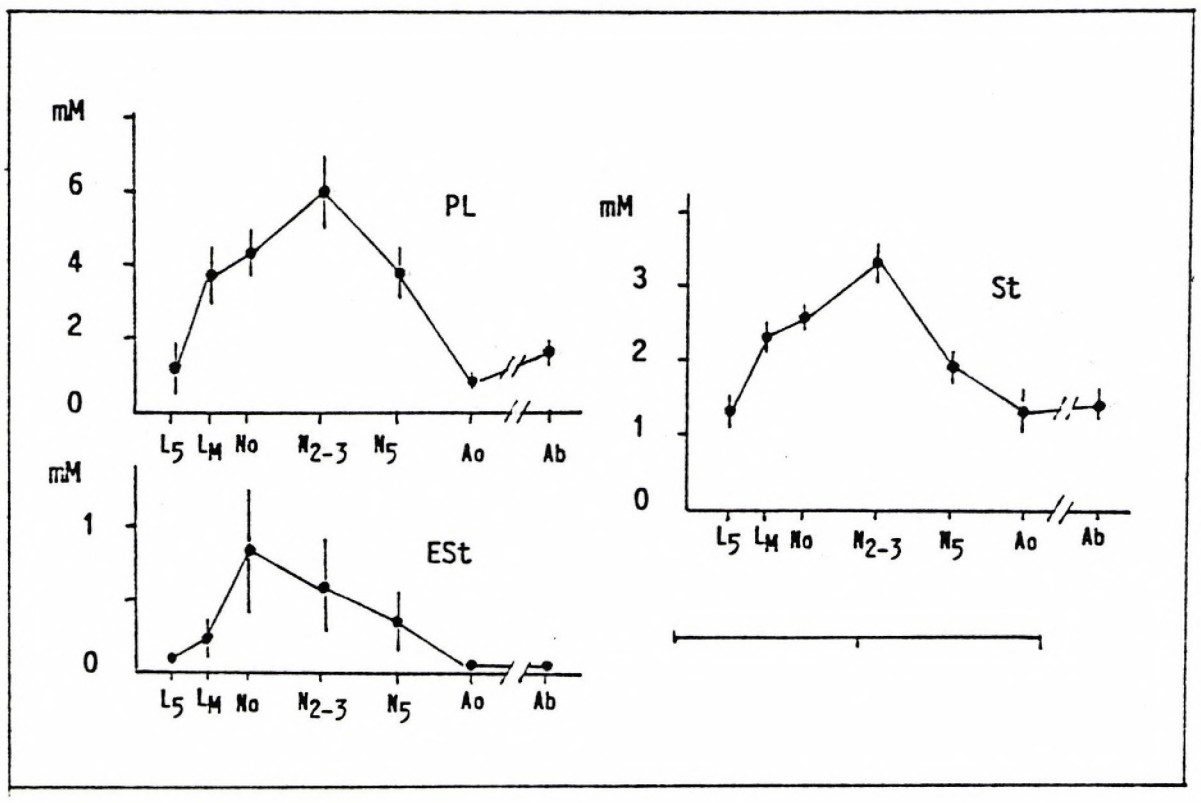


Fig. 15 - Variations des concentrations en phospholipides (PL), stéroïdes libres (St) et stéroïdes estérifiés (ESt) dans l'hémolymphe d'Abeilles. Symboles utilisés pour les divers stades : voir dans le texte.

Tableau 15 - Variations des concentrations (mM) des triglycérides dans l'hémolymphe d'Abeilles à différents stades du développement. Les moyennes et les écarts-types sont donnés pour 2 déterminations. Les longueurs de chaînes de TG 1, TG 2, TG 3, TG 4 augmentent jusqu'à des valeurs > C18 (TG 4).

Stages	TG 1	TG 2	TG 3	TG 4
L_5	Tr ^{a}	Tr ^{a}	Tr ^{a}	0.11(0.07)^a
L_M	0.097(0.006)^c	0.10(0.05)*	0.09(0.02)*	63.1 (18.8)^b
No	0.36 (0.09)^b	0.31(0.07)^b	0.27(0.08)^b	127.0 (38.0)^c
N_{2-3}	0.66 (0.36)^b	0.07(0.02)*	0.10(0.03)*	101.3 (28.6)^c
N_5	Tr ^{a}	Tr ^{a}	Tr ^{a}	22.1 (7.3)^c
Ao	Tr ^{a}	Tr ^{a}	Tr ^{a}	0.065(0.026)^a
Ab	Tr ^{a}	Tr ^{a}	0.86(0.25)^a	0.40(0.16)^a

(tr = traces only)
a. b. c : significantly different from one another at P=0.05
* : not statistically different from one another

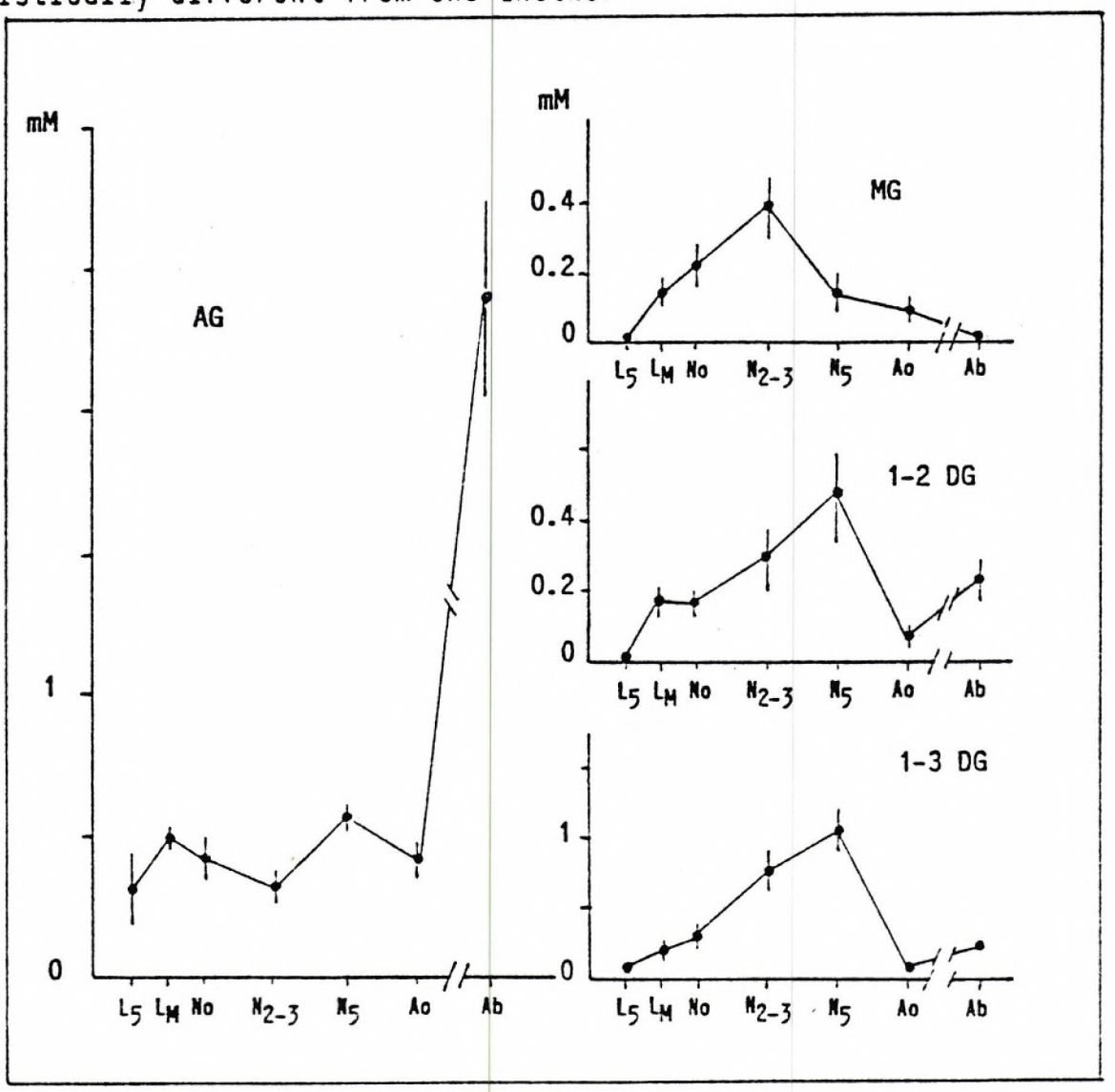


Fig. 16 - Variations des concentrations en acides gras (FA) mono-glycérides (MG) diacylglycérides 1-2 et 1-3 (DG 1-2 et DG 1-3) dans l'hémolymphe d'Abeilles. Symboles utilisés pour les divers stades : voir dans le texte.

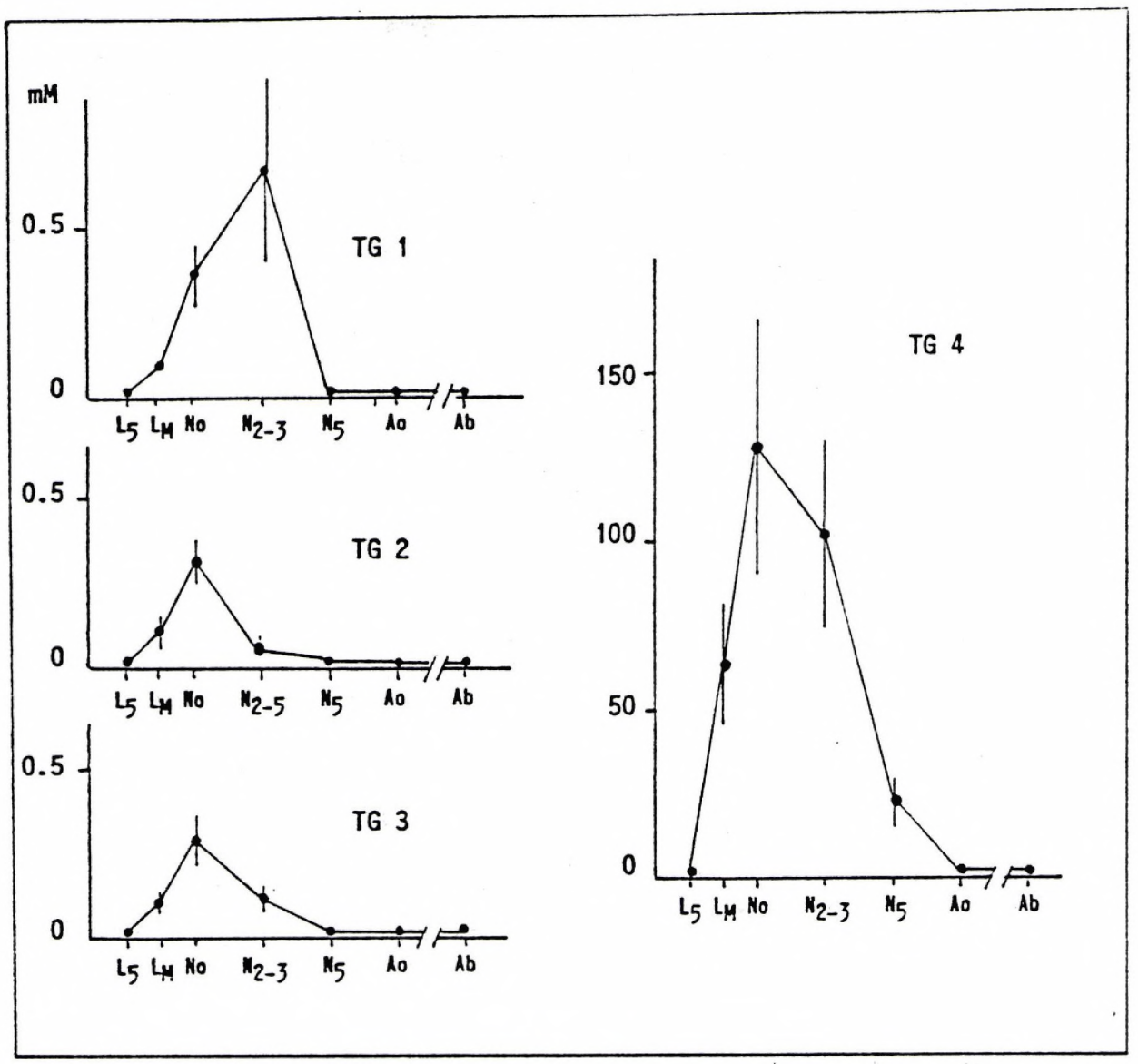


Fig. 17 - Variations des concentrations en triglycérides (TG 1 à TG 4 dans l'ordre croissant des longueurs de chaînes) dans l'hémolymphe d'Abeilles. Symboles utilisés pour les divers stades : voir dans le texte.

La Science est l'art de la neutralité
(A. Koestler, 1968. Le Cheval dans la locomotive
Calmann Lévy, p. 311)

6 - Héritabilité de la glycémie de l'abeille : difficultés d'étude liées à des facteurs extérieurs.

(Mlle H. MOHSSINE*, M. BOUNIAS et J.M. CORNUET**)

*DEA soutenu en octobre 1985 à l'Université Paris-sud

**INRA Avignon : station de Zoologie

L'objectif de ce travail était de tenter d'évaluer l'héritabilité de la glycémie en comparant les valeurs mesurées dans des groupes de colonies filles constituées à partir de reines différentes. Le principe consistait à comparer la variabilité mesurée à l'intérieur des familles à la variabilité mesurée entre familles différentes.

Les résultats portant sur 11 familles différentes et 2 à 6 colonies par famille sont indiqués dans les tableaux 16 et 17. Trois répétitions ont été opérées pour chaque colonie, toujours à partir d'abeilles naissantes. La quantité de travail a nécessité un étalement des mesures sur plusieurs mois.

Le calcul direct de l'héritabilité a donné un résultat nul pour plusieurs raisons convergentes.

En premier lieu, comme le montre le tableau 16, à l'exception d'une seule famille (n°2), les autres ont une glycémie extrêmement homogène. Il n'est pas surprenant, dès lors, que des facteurs externes aient pu conférer à la variabilité des résultats au sein de chaque famille des valeurs élevées par comparaison avec les écarts -très faibles- entre familles.

Tableau 16 - Dosage de la glycémie dans une population d'abeilles.

Tableau des moyennes par colonies et par familles.

Famille	Colonie	GLUCOSE		TREHALOSE	
		$\bar{x}$	σ_n	$\bar{x}$	σ_n
1	1	3,48	1,69	15,41	7,39
	2	3,98	0,18	13,48	5,66
	3	5,08	1,39	15,02	7,25
		4,18	1,43	14,64	6,86
2	4	6,06	0,74	17,58	2,93
	5	9,70	5,89	35,79	20,58
		7,88	4,58	26,68	17,29
3	6	3,16	2,09	14,01	6,68
	7	3,82	1,59	13,55	7,74
	8	3,51	1,34	12,86	7,29
		3,50	1,72	13,47	7,27
4	9	3,28	2,22	13,42	1,51
	10	2,49	1,28	11,73	6,90
	11	4,11	0,67	11,96	7,33
	12	3,15	1,55	11,24	6,04
	13	4,77	0,93	15,95	2,35
		3,56	1,64	12,86	5,66
5	14	3,46	2,14	11,35	9,63
	15	3,55	1,81	13,55	8,50
		3,50	1,98	12,45	9,15
10	32	3,43	1,77	12,95	7,28
	33	3,42	2,-	17,31	11,08
	34	4,40	1,82	10,-	8,82
	35	3,41	0,72	13,872	5,70
	36	5,16	0,58	16,68	0,23
	37	5,45	1,52	13,21	7,26
		4,21	1,73	14,00	7,90
11	38	4,55	1,66	16,15	7,70
	39	3,53	1,77	11,17	1,09
	40	4,23	2,18	15,42	8,51
		4,10	1,93	14,25	7,01

Tableau 17 - Classement des familles par ordre décroissant des glycémies moyennes (mM).

Familles n°	Tréhalosémie	Familles n°	Glucosémie
2	26,68	2	7,88
1	14,64	10	4,21
9	14,36	1	4,18
10	14,25	11	4,10
11	14,00	9	3,94
3	13,47	6	3,76
4	12,86	8	3,66
8	12,75	4	3,56
5	12,45	3	3,50
7	12,43	5	3,50
6	12,12	7	3,22

L'un de ces facteurs extérieurs de variabilité a pu être assez clairement identifié, expliquant l'origine des fluctuations inhérentes à l'étalement des mesures dans le temps : il s'agit du cycle lunaire.

L'influence du cycle lunaire sur la physiologie de l'abeille a été suggérée par M. BOUNIAS, sur la base d'arguments bibliographiques et expérimentaux. Les travaux de Oehmke (1973) ont d'abord montré que l'activité de vol de l'abeille présente un rythmicité liée aux phases de la lune. D'autre part, Rounds (1983) a montré que l'efficacité de l'action de la noradrénaline et de l'acétylcholine sur l'accélération du rythme cardiaque de la blatte varie de 20 à 60 % également selon les phases de la lune. La glycémie de l'abeille étant sous contrôle adrénergique, ainsi que nous l'avons démontré, il n'était donc pas surprenant que ses variations soient liées au même cycle.

Des données numériques portant sur les années 1979 à 1981 sont en cours d'analyse, sous ce point de vue. La fig. 18 montre un résultat partiel relatif à l'année 1981. L'analyse des données relatives

aux années précédentes, ainsi que celles concernant les variations de la lipémie, sont en cours.

Les résultats numériques obtenus par Mlle Mohssine ont été soumis à une analyse statistique : la courbe "de répétabilité" des valeurs en fonction des phases lunaires (cycle de 29 jours) a donné des maxima coïncidant avec la pleine lune et avec la nouvelle lune.

Il apparaît ainsi que des facteurs inattendus peuvent interférer avec des mesures physiologiques, en agissant sur des paramètres biochimiques quantitatifs.

Le travail, tel qu'il se présentait ne pouvait donc permettre de tirer de conclusion en ce qui concerne l'héritabilité de la glycémie. Il serait, toutefois, intéressant de connaître la productivité moyenne des colonies, afin de voir si les corrélations mises en évidences (Bounias, 197) se manifestent, en dépit du resserrement des valeurs de la glycémie.

Références :

Bounias M., 1981 - J. Apic. Res., **20**, 215-220

Oehmke M.C., 1973 - Interdiscipl. Cycle Res., **4**, 319-335

Rounds H.D., 1983 - Comp. Biochem. Physiol. **C**, **74**, 373-376

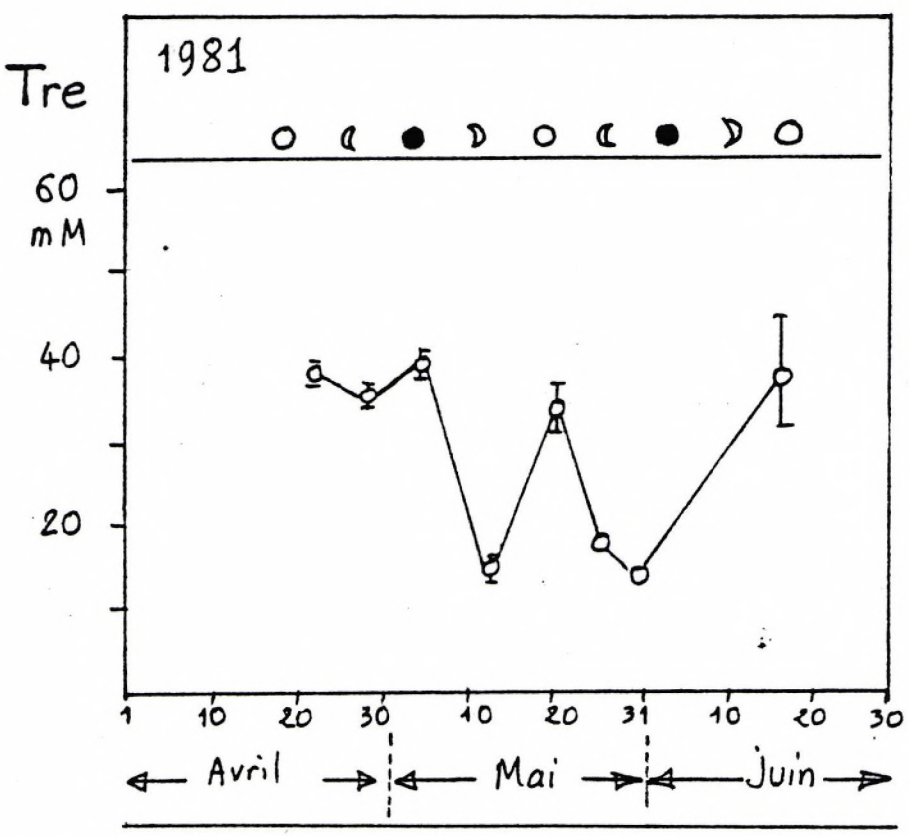


Fig. 18 - Rythmicité de la glycémie d'abeilles naissantes (M. Bounias)

7 - Projets de Recherches

Les travaux relatifs à la régulation du métabolisme glucido-lipidique se poursuivent sous plusieurs angles :

A - Comparaison du mode d'action des adrénerqigues et du glucagon : action "croisée" du propranolol et de la somatostatine

B - Comparaison de l'action de la noradrénaline et du glucagon avec celle de l'AMPc. Interaction de la somatostatine

C - Action directe d'effecteurs hormonaux sur les tréhalases de l'abeille.

Ce programme, proposé depuis de nombreuses années par le laboratoire de Biochimie (1)(2) n'avait pu être mis en pratique faute de moyens. L'équipe du Professeur Downer, au Canada, en a publié une première application en 1984 (5 ans après !) et dès 1986, grâce aux travaux de l'équipe des Drs Moreau et Gourdoux, à Bordeaux, de nouveaux développements seront abordés en collaboration avec le Laboratoire de Biochimie.

(1) M. Bounias, C.R. Ann. Trav. Lab. Biochimie, 7, 1978, p. 51
(2) M. Bounias, 11 Avril 1979. Propositions de programmes/Commission de Biochimie-INRA

La Biochimie peut se mettre au
service soit de la lumière, soit des ténèbres.
(A. Koestler, 1968. Le cheval dans la locomotive,
Calmann Lévy, p. 311)

II - BIOCHIMIE THANATOLOGIQUE ET CRYPTO TOXICOLOGIQUE

1 - Action de la deltaméthrine à dose sublétale sur la glycémie, l'amino-acidémie et les phosphatases intestinales de l'abeille.

Ce travail, effectué dans le cadre des accords officiels de collaboration Franco-Yougoslave, a été présenté en détails dans le précédent compte-rendu. Il a été, maintenant, publié dans "Pesticide Biochemistry and Physiology", dont ci-après, reproduction "fac similé" de la première page.

PESTICIDE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY 24, 149–160 (1985)

Sublethal Effects of a Synthetic Pyrethroid, Deltamethrin, on the Glycemia, the Lipemia, and the Gut Alkaline Phosphatases of Honeybees

M. BOUNIAS

Laboratory of Biochemistry, INRA-Avignon, BP 91, F84140 Montfavet, France

AND

N. DUJIN AND D. S. POPESKOVIĆ

Department of Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Yugoslavia

Received June 4, 1984; accepted October 24, 1984

A sublethal dose (0.1 pmol per honeybee, i.e., approx. 0.9 pmol/g body wt) of the synthetic pyrethroid, deltamethrin, was injected intrathoracically into the hemocoel of emerging bees and the biochemical effects were determined over a period of 3 hr. The variations in hemolymph concentrations of trehalose, glucose, phospholipid, steroid, and diacylglycerol were limited, but large variations were observed for other lipids. Mono- and triacylglycerols increased dramatically 1.5 hr after injections; then a peak of free fatty acid appeared at the same time (3 hr) as the monoacylglycerols reached their maximum and the triacylglycerols started to decrease. Atypical forms of triacylglycerols accumulated from 1.5 hr to a maximum level 2 hr after injection. Then, after 3 hr, the concentrations of regular fatty acids, monoacylglycerols, and atypical triacylglycerols returned to normal while longer-chain fatty acids and different forms of ceride simultaneously appeared. The gut alkaline phosphatase parameters (V_M, K, and Hill coefficient) also showed large variations 1.5 and 2 hr after injection, indicating an initial inhibition phase followed by superimposed induction and inhibition mechanisms. These data are discussed according to the hemolymph–lipid transport scheme from the biosynthetic to the utilization sites. Hormone release associated to mitochondrial alteration could be responsible for the observed effects. © 1985 Academic Press, Inc.

INTRODUCTION

It is well established that even very low doses of pyrethroid insecticides are able to induce marked increases in the frequency of electrical activity of insect neurosecretory cells (1), which may result in the release of neurohormones (2). Since these hormonal discharges would therefore occur regardless of the natural requirements for the cellular regulatory processes, a large pattern of various—and even contradictory or antagonistic—effects can be expected at the level of the insect glycemia and lipemia (3). As a matter of fact, such glycemic and lipemic disorders have already been described, following the action of different organochlorine and organophosphorous insecticides (4, 5). But, recently, experiments on locusts have confirmed that a synthetic pyrethroid (bioresmethrin) not only increases the electrical activity of the glandular and storage lobes of the corpora cardiaca, but also induces a discharge of hyperlipemic hormone (6).

Among the synthetic pyrethroids, deltamethrin, one of the most active, as reviewed by Elliott (7), is now being used in such cultures as Colza which require a proper pollination. This raises questions of hazardous effects to bees during their foraging work and of the effectiveness of their pollinating action, since the deltamethrin shows knockdown and killing effects, and also some repellent action (8).

For all these different reasons, and be-

0048-3575/85 $3.00
Copyright © 1985 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

2 - Perturbations des relations glucido-lipidiques provoquées par le jeûne chez l'abeille.

Parmi les manifestations d'intoxications possibles, chez l'abeille, l'une peut se traduire par une anorexie plus ou moins prononcée. Là encore, il était nécessaire de pouvoir disposer de données de référence permettant de comparer les effets sublétaux d'un toxique à ceux entraînés par le jeûne lui-même.

Les résultats partiellement présentés dans le précédent rapport ont été complétés et présentés au colloque de la Société de Biologie du 21 Mars 1985 au centre CNRS de Montpellier.

Une partie complémentaire a été publiée aux Comptes Rendus de l'Académie des Sciences : le texte en est présenté dans les pages suivantes.

C. R. Acad. Sc. Paris, t. 300, Série III, n° 9, 1985 381

BIOCHIMIE GÉNÉRALE. — *Corrélations fonctionnelles glucido-lipidiques dans l'hémolymphe d'Abeilles soumises au jeûne.* Note de **Michel Bounias,** présentée par Jean Roche.

Dans l'hémolymphe d'Abeilles ouvrières naissantes, l'analyse des variations concomitantes de la glycémie et de la lipémie, au cours d'une période de 48 h de jeûne, fait apparaître des corrélations positives hautement significatives entre les stéroïdes, les diglycérides 1-2, les triglycérides, et le tréhalose, dont les concentrations sont rétablies au bout de 30 h sous l'action d'un stimulus paraissant lié à la faiblesse des teneurs atteintes au bout de 21 h. Par contre, la tréhalosémie est en corrélation négative avec les concentrations d'une fraction d'acides gras à longues chaînes qui tendent à s'accumuler jusqu'à 48 h.

GENERAL BIOCHEMISTRY. — Carbohydrate versus lipid functional relationships in the haemolymph of starved bees.

In the haemolymph of emerging workerbees, a survey of the simultaneous variations of the carbohydrate and lipid concentrations over a 48 hrs. starvation period, reveals highly significant positive correlation between sterol, diacyl 1-2 glycerol, triacylglycerol and trehalose; their concentrations are restored after 30 hrs. following a stimulus possibly linked to the weakness of the concentrations at 21 hrs. By contrast, the trehalosemia is negatively correlated to a fraction identified as long chain fatty acid which accumulates up to 48 hrs.

INTRODUCTION. — L'étude des processus physiologiques mis en œuvre au cours du jeûne, constitue une intéressante voie d'appréciation des capacités régulatrices d'un organisme vivant. Chez les insectes, Friedman [1] montrait, dès 1967, qu'après 24 h de jeûne, la glycogénolyse était accrue chez un Diptère, tandis que Hill et Goldsworthy [2] mettaient en évidence chez des Orthoptères soumis à un jeûne prolongé, une mobilisation des lipides dont Jutsum et coll. [3] ont montré qu'il s'agissait principalement de diglycérides. Une intéressante complémentarité physiologique entre glucides et lipides apparaît chez le Criquet migrateur, où des stimuli hormonaux successifs entrent en jeu au cours de l'envol : l'énergie nécessaire au travail musculaire est apportée dès le départ sous la forme de glucides, puis par des lipides qui en prennent, en quelque sorte, le relais (Cheeseman et Goldsworthy [4], Van Der Horst et coll. [5]). Or, ce mécanisme physiologique était déjà suggéré en 1977 par Mwangi et Goldsworthy [6] montrant que l'ingestion de glucides par des Criquets abaisse leur lipémie préalablement accrue par le jeûne, et que l'injection de tréhalose abaisse les concentrations de leurs diglycérides dans l'hémolymphe. Il ne semble pas, toutefois, que ces observations puissent être généralisées, puisque chez d'autres Orthoptères, la lipémie, comme la tréhalosémie, subissent, au cours de 10 jours de jeûne, une diminution accompagnée d'importantes oscillations (Boulbes [7]), tandis que chez un Hétéroptère (lygaeidae), la lipémie et la tréhalosémie, diminuent simultanément au cours de la première semaine (Bongers et Eggermann [8]).

Il paraissait donc intéressant d'observer l'influence du jeûne sur les relations glucido-lipidiques dans l'hémolymphe de l'Abeille dont les réserves des tissus abdominaux ne sont pas particulièrement importantes [9], ce qui réduit sa résistance au jeûne au point qu'en 1937, Beutler [10] en déduisait que « l'Abeille ne possède pas de mécanisme régulateur de la glycémie ».

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les Abeilles ouvrières naissantes (*Apis mellifera, mellifera* L.), sont prélevées dans les alvéoles encore operculés et introduites par groupe de cinq dans des tubes de Borel de 150 ml contenant un tampon de papier filtre humide. Les tubes sont placés aussitôt à l'obscurité à 21 ± 1°C. Des prélèvements d'hémolymphe sont effectués dès le début puis au bout de 7, 21, 30 et 48 h, temps au bout duquel aucune mortalité n'apparaît encore. La comparaison avec des Abeilles nourries artificiellement est, ici, de peu d'intérêt, en raison des fluctuations glucidiques survenant par induction enzymatique [11], mais l'examen des augmentations naturelles de la glycémie [12] et de la lipémie [9] au cours de l'évolution physiologique des adultes ouvrières, du stade naissantes au stade butineuses, montre qu'en 48 h, ces mêmes augmentations ne peuvent

0249-6313/85/03000381 $2.00 © Académie des Sciences

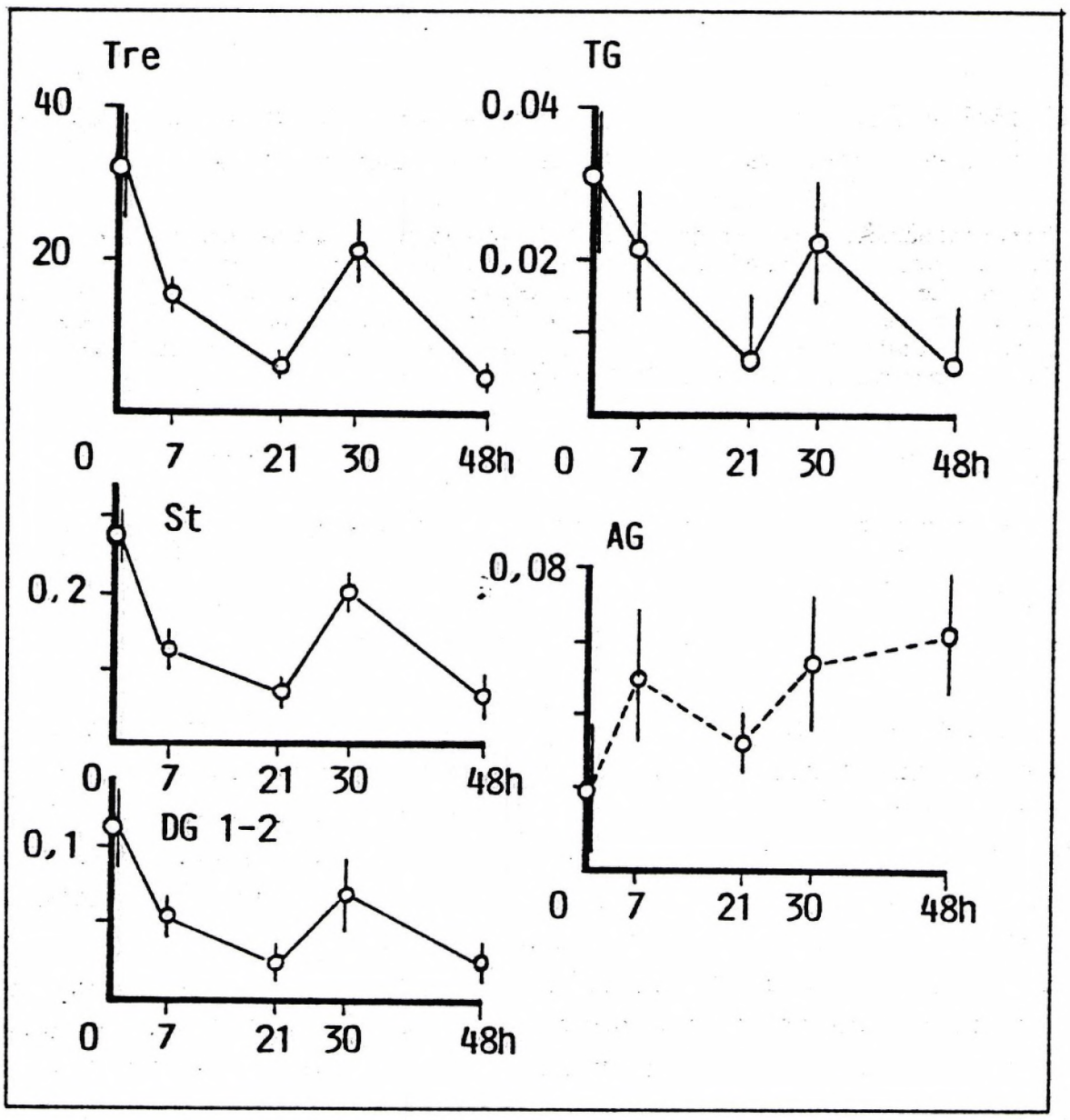


Fig. 19

Variations des concentrations (mM) du tréhalose (Tre), des stéroïdes (St), des diglycérides 1-2 (DG 1-2), des triglycérides (TG), et des acides gras à longues chaînes (AGL) dans l'hémolymphe d'Abeilles naissantes exposées à 48 h de jeûne.

Variations of the haemolymph concentrations (mM) of trehalose (Tre), sterol (St), diacyl 1-2 *glycerol (DG* 1-2), *triacylglycerol (TG) and long chain fatty acid (AGL) in emerging bees, over a* 48 *hrs. starvation period.*

guère excéder 10 à 25 % des valeurs initiales, ce que confirment des analyses effectuées à partir d'Abeilles naissantes conservées sur leurs cadres pendant 24 h.

Les glucides et les lipides sont extraits et dosés par « nanochromatographie quantitative en couche mince » selon les techniques décrites ailleurs [13]. Les étalons utilisés pour les dosages sont : le tréhalose, le cholestérol, les acides oléïque et lignocérique, la dioléïne 1-2 et la trioléïne. Les intervalles de confiance sont calculés, au seuil 5 ‰, à partir de trois mesures. Les probabilités de signification associées à la valeur des coefficients de corrélations sont calculées d'après l'équation de distribution de « t » de Student.

RÉSULTATS. — La figure met en évidence une évolution de même sens du tréhalose (Tre), des stéroïdes (St), des diglycérides 1-2 (DG 1-2) et des triglycérides (TG), tandis qu'une fraction de mobilité correspondant à celle d'acides gras à longues chaînes (AGL : >C24) varie en sens opposé.

La tréhalosémie est très fortement abaissée jusqu'à atteindre 18 % de la valeur initiale au bout de 21 h, de même que la lipémie qui en atteint 23, 21 et 18 % respectivement pour les fractions St, DG 1-2 et TG. Au bout de 30 h, la tréhalosémie remonte à 65 % de la valeur initiale, et les fractions St, DG 1-2 et TG respectivement à 68, 62 et 68 % (toutes ces différences étant significatives à $p<0,05$).

Les paramètres de corrélations et de régressions linéaires entre les fractions lipidiques et le tréhalose sont indiqués dans le tableau.

TABLEAU 17

Paramètres des corrélations et régressions linéaires établis entre les concentrations de certains lipides et du tréhalose de l'hémolymphe d'abeilles, au cours d'une période de 48 h de jeûne. σ_b, écart-type de la pente b.

Correlation and regression parameters between honeybees haemolymph concentrations of lipid and trehalose, over a 48 hrs. starvation period. σ_b, *standard deviation of the slope b.*

Composés en corrélations	(N)	Corrélations		Régressions $y=a+bx$	
		ρ	$P_{(\rho)}$	b	σ_b
Stéroïdes/tréhalose	(5)	0,003	0,0007	0,0080	0,0005
DG 1-2/tréhalose	(5)	0,995	0,0004	0,0031	0,0002
TG/tréhalose	(5)	0,974	0,005	0,0009	0,00014
AG/tréhalose	(5)	−0,529	0,35	−0,0008	0,0007
AG/tréhalose	(4) (a)	−0,887	0,11	−0,0014	0,0005

(a) point 21 h exclu.

Les corrélations positives sont très hautement significatives, mais en revanche, la corrélation négative entre les acides gras, à longues chaînes et le tréhalose est faible en raison d'une déviation importante du point correspondant à 21 h de jeûne : ce point, étant exclu, les paramètres acquièrent une signification plus élevée.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS. — Les corrélations positives suggèrent l'hypothèse d'un couplage des trois fractions lipidiques concernées (St, DG 1-2, TG), soit dans une même structure de transport étroitement associée à la valeur de la tréhalosémie, soit sous forme d'une dérivation métabolique placée sous la dépendance directe des concentrations du tréhalose. Sur ce dernier point, la biosynthèse des stéroïdes n'ayant pas été démontrée chez les Insectes, leur mobilisation en corrélation étroite avec la tréhalosémie retient l'attention, et pourrait conduire à revoir la question sous l'angle du déterminisme des processus de mobilisation fonctionnelle des molécules pré-existantes. Quant à la structure lipoprotéique, elle pourrait correspondre à la lipophorine [14] déjà suggérée dès 1962 par les travaux de Tietz [15].

Par contre, la corrélation négative suggère une relation réciproque d'inter-dépendance entre les acides gras à longues chaînes et le tréhalose. Des recherches sont en cours pour analyser les diverses inter-relations, apparemment plus complexes, entre les autres composants glucidiques et lipidiques de l'hémolymphe, mais il apparaît d'ores et déjà que la lipémie de l'Abeille se distribue vraisemblablement en plusieurs groupes dont les fonctions physiologiques seraient différentes. En ce sens, les résultats obtenus chez l'Abeille ne peuvent se rattacher complètement à aucun des cas précédents tels qu'ils ont été décrits chez des Orthoptères ([6], [7]) et chez des Hétéroptères [8]. L'abaissement considérable des ressources énergétiques dans l'hémolymphe après 21 h pourrait, d'autre part, être à l'origine d'un double signal hormonal se manifestant dès la 30e heure par une hyperglycémie et une hyperlipémie, ce qui distingue également l'Abeille du Grillon où les lipides fluctuent de manière différente [7]. Il est intéressant d'observer que, dans le cas des acides gras à longues chaînes, le point situé à 21 h de jeûne, c'est-à-dire précisément au moment du « signal » hypothétique, s'écarte de la relation générale par valeur inférieure, et contribue peut-être, de la sorte, au déclenchement du processus de rétablissement de la lipémie et de la glycémie. Il serait sans doute prématuré d'en déduire une relation de causalité, mais il est permis d'espérer que l'étude attentive des relations fonctionnelles

glucido-lipidiques se manifestant sous l'action de diverses hormones de régulation métabolique (objet de nos recherches en cours), puisse, sur ce plan, s'avérer riche d'enseignements.

Remise le 14 janvier 1985.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] S. FRIEDMAN, *J. Insect Physiol.*, 13, 1967, p. 397.
[2] L. HILL et G. J. GOLDSWORTHY, *Comp. Biochem. Physiol.*, 36 B, 1970, p. 61-70.
[3] A. R. JUTSUM, H. C. AGARWAL et G. J. GOLDSWORTHY, *Acrida*, 4, 1978, p. 47-56.
[4] P. CHEESEMAN et G. J. GOLDSWORTHY, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 37, 1979, p. 35-44.
[5] D. J. VAN DER HORST, N. M. D. HOUBEN et A. M. Th. BEENAKKERS, *J. Insect Physiol.*, 26, 1980, p. 441-448.
[6] R. W. MWANGI et G. J. GOLDSWORTHY, *J. Insect Physiol.*, 23, 1977, p. 1275-1280.
[7] B. BOULBES, *Thèse de 3e cycle*, Montpellier, 1984, 161 p.
[8] J. BONGERS et W. EGGERMANN, *Insect Biochem.*, 5, 1975, p. 1-14.
[9] M. BOUNIAS, *C.R. Soc. Biol.*, 177, 1983, p. 14-21.
[10] R. BEUTLER, *Z. Vergl. Physiol.*, 24, 1937, p. 71-115.
[11] M. BOUNIAS et M. R. J. MORGAN, *I.R.C.S. Med. Sci. : Biochemistry*, 12, 1984, p. 769-770.
[12] M. BOUNIAS, *Comp. Biochem.*, 69 B, 1980, p. 471-477.
[13] M. BOUNIAS, *L'analyse biochimique par nanochromatographie en couche mince*, Masson, 1983, 205 p.
[14] H. CHINO et R. G. H. DOWNER, *Adv. Biophys.*, 15, 1982, p. 67-92.
[15] A. TIETZ, *J. Lipid. Res.*, 3, 1962, p. 421.

Laboratoire de Biochimie I.N.R.A., Avignon,
Domaine Saint-Paul, B.P. n° 91, 84140 *Montfavet.*

3 - Etude des mécanismes biochimiques d'action de la delta-endotoxine de Bacillus thuringiensis (var. israelensis) sur les larves de Aedes aegypti.

Ce programme constituait le sujet de thèse de 3e cycle de M. B. NIzeyimana. Les travaux ont été effectués au Laboratoire de Biochimie, en relation avec M. le Professeur Vago, Membre de l'Institut, directeur de la station de Pathologie comparée de St-Christol-lès-Alès.

La thèse a été soutenue le 3 Mai, et l'excellente soutenance a valu à l'impétrant la mention très honorable et les félicitations du jury, composé de : M. le Prof. VAGO : Président
M. le Prof. EUZET : Assesseur
Dr. M. BOUNIAS
Dr. C.P. VIVARES

Le contenu, rapidement présenté dans les pages suivantes sous la forme du plan détaillé du manuscrit, représente l'une des premières applications à la toxicologie des Insectes, des principes définis par M. Bounias à partir du concept de "relations fonctionnelles". Les modifications apportées à ces relations lors de l'intoxication ont permis de caractériser de manière très fine les effets de diverses doses, d'où est apparue la nécessité de remettre en cause la notion de dose sans effet et d'introduire le concept de "crypto-toxicologie" qui sera prochainement présenté à l'Académie des Sciences.

M. Nizeyimana est maintenant rentré dans son pays, le Rwanda, où il a été recruté en qualité de Maître-assistant d'Université, et formule le voeux de pouvoir poursuivre des recherches en bénéficiant de l'appui scientifique du Laboratoire de Biochimie.

RESUME

La première analyse comparative des glucides, lipides; amino-acides des larves de *Aedes aegypti* saines et soumises aux doses létales DL 10, DL 50, DL 100 et 10.DL 100 de la delta-endotoxine de B.t.i. a été effectuée.

L'action de la toxine est précoce y compris pour la plus faible dose. L'accumulation des acides aminés, du glucose et des phospholipides au détriment du tréhalose, des stéroïdes, des triglycérides et des acides gras est notée sous l'action des doses élevées.

Parmi la vingtaine des inter-relations métaboliques établies, certaines sont pertubées significativement, elles sont caractéristiques soit des faibles doses, soit des fortes doses.

L'importance des effets des faibles doses est mise en évidence, au niveau métabolique, en l'absence d'effets extérieurs visibles.

SOMMAIRE PA-

AVANT-PROPOS

INTRODUCTION.....

PREMIERE PARTIE

POSITION DU SUJET ET METHODES D'ETUDE.....4

CHAPITRE 1: EVOLUTION DES CONNAISSANCES SUR LA BIOCHIMIE DES DIPTÈRES CULICIDES

1.1. BIOCHIMIE DU MOUSTIQUE SAIN.....5

1.1.1. Glucides.....5

1.1.2. Lipides 6

1.1.3. Amino acides.....7

1.2. ACTIONS BIOCHIMIQUES DE LA TOXINE DES SEROTYPES DU *BACILLUS THURINGIENSIS* SUR LE MOUSTIQUE.....9

1.3. ACTIONS BIOCHIMIQUES D'AUTRES AGENTS PATHOGENES SUR LE MOUSTIQUE.....11

1.3.1. Glucides.....11

1.3.2. Lipides.....12

1.3.3. Amino acides.....13

1.4. ACTIONS BIOCHIMIQUES DE LA TOXINE DES SEROTYPES DU *B. THURINGIENSIS* ET D'AUTRES AGENTS PATHOGENES SUR D'AUTRES INSECTES.....14

1.4.1. Actions biochimiques des sérotypes de *B. thuringiensis* sur d'autres insectes 14

PAGES

1.4.2. Actions biochimiques d'autres agents pathogènes sur d'autres insectes.....16

1.4.2.1. Glucides.....16

1.4.2.2. Lipides.....17

1.4.2.3. Amino acides.....18

CONCLUSIONS.....20

CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES.....21

2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE.....21

2.1.1. Insecte utilisé: *Aedes aegypti*.....21

2.1.1.1. Position taxinomique et biologie.....21

2.1.1.2. Elevage.....21

2.1.2. La toxine de l'agent pathogène utilisée.....24

2.1.2.1. La toxine du *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.....24

2.1.2.2. Méthodes de détermination de la sensibilité des larves à la toxine du B.t.i.....24

2.2. METHODES DE MICRO-ANALYSE BIOCHIMIQUE QUANTITATIVE PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE.....26

2.2.1. Principe.....26

2.2.2. Préparation des plaques.....26

2.2.3. Préparation des échantillons.....27

2.2.3.1. Glucides et amino acides de l'hémolymphe.....27

2.2.3.2. Lipides du tissu adipeux.....27

2.2.4. Cuves chromatographiques.....28

2.2.5. Les solvants d'élution et migrations successives.....28

PAGES

2.2.5.1. Glucides.....28
2.2.5.1.1. Essais de mise au point des systèmes d'éluants.....28
2.2.5.1.2. Choix d'éluants utilisés.....31
2.2.5.2. Amino acides.....31
2.2.5.2.1. Essais de mise au point des systèmes d'éluants.....31
2.2.5.2.2. Choix d'éluants utilisés.....34
2.2.5.3. Lipides.....35
2.2.5.3.1. Essais de mise au point des systèmes d'éluants.....35
2.2.5.3.2. Choix d'éluants utilisés.....36
2.2.6. La révélation.....36
2.2.6.1. Principe.....36
2.2.6.2. Réactifs de détection.....36
2.2.6.2.1. Glucides.....36
2.2.6.2.2. Amino acides.....37
2.2.6.2.3. Lipides.....37
2.2.7. Enregistrement du chromatogramme.....37
2.2.7.1. Photométrie.....37
2.2.7.2. Les longueurs d'ondes utilisées.....38
2.2.8. Analyse qualitative.....38
2.2.9. Analyse quantitative.....39
2.3. METHODES STATISTIQUES UTILISEES.....40
2.3.1. Comparaison des variances et des moyennes.....40
2.3.2. Analyse des variances par la méthode des couples.....41
2.3.3. Corrélations et régression.....41

PAGES

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DES EFFETS BIOCHIMIQUES DE LA DELTA-ENDOTOXINE DU *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENSIS* SUR LES LARVES DU IVe STADE D'*AEDES AEGYPTI* 42

CHAPITRE 1: ETUDE DE LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE DE L'HEMOLYMPHE ET DU TISSU ADIPEUX DES LARVES SAINES 43

1.1. COMPOSITION EN GLUCIDES DE L'HEMOLYMPHE 43

1.1.1. Résultats 43

1.1.2. Discussion 48

1.2. COMPOSITION EN AMINO ACIDES DE L'HEMOLYMPHE 51

1.2.1. Résultats 51

1.2.2. Discussion 58

1.3. COMPOSITION EN LIPIDES DU TISSU ADIPEUX 61

1.3.1. Résultats 61

1.3.2. Discussion 61

CHAPITRE 2: ETUDE CINETIQUE DES VARIATIONS DE COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES LARVES EN CONTACT AVEC LA TOXINE DU *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENSIS* 66

2.1. LES GLUCIDES 66

2.1.1. Résultats 66

2.1.1.1. Glycogène 66

2.1.1.2. Glucides inconnus 68

2.1.1.3. Tréhalose 73

2.1.1.4. Glucose 75

PAGES

2.1.1.5. Glucides totaux.....77
2.1.2. Discussion.....81
2.2. LES AMINO ACIDES DE L'HEMOLYMPHE 85
2.2.1. Résultats 85
2.2.1.1. Lysine.....85
2.2.1.2. Arginine.....87
2.2.1.3. Cystéine.....89
2.2.1.4. Histidine.....91
2.2.1.5. Acide aspartique.....93
2.2.1.6. Asparagine 95
2.2.1.7. Sérine 97
2.2.1.8. Glycocolle.....99
2.2.1.9. Acide glutamique + glutamine 101
2.2.1.10. Thréonine 103
2.2.1.11. Alanine 106
2.2.1.12. Proline 108
2.2.1.13. Tryptophane 108
2.2.1.14. Valine 111
2.2.1.15. Méthionine 111
2.2.1.16. Phénylalanine 111
2.2.1.17. Tyrosine 115
2.2.1.18. Isoleucine 117
2.2.1.19. Leucine 119
2.2.1.20. Les composés non identifiés 119
2.2.1.21. Les amino acides totaux 127
2.2.2. Discussion 133

PAGES

2.3. LES LIPIDES DU TISSU ADIPEUX 140

2.3.1. Résultats 140

2.3.1.1 Phospholipides 140

2.3.1.2 Monoglycérides 142

2.3.1.3. Acides gras 142

2.3.1.4. Stéroïdes 148

2.3.1.5. Diglycérides 1-2 150

2.3.1.6. Triglycérides 153

2.3.1.7. Lipides totaux 155

2.3.2. Discussion 160

CONCLUSIONS 163

PAGES

TROISIEME PARTIE

ETUDE DES INTER-RELATIONS FONCTIONNELLES 168

CHAPITRE 1: LES INTER-RELATIONS METABOLIQUES CHEZ LES LARVES SAINES.....169

1.1. RELATIONS INTRA-GLUCIDIQUES.....169

1.1.1. Tréhalose/Glucose 169

1.2. RELATIONS INTRA-LIPIDIQUES 172

1.3. RELATIONS INTRA-AMINOACIDES.....173

1.3.1. Les inter-relations métaboliques normales.....173

1.3.1.1. Glycocolle/Sérine.....174

1.3.1.2. Alanine/Sérine 175

1.3.1.3. Cystéine/Sérine 176

1.3.1.4. Cystéine/Thréonine 178

1.3.1.5. Isoleucine/Thréonine.....179

1.3.1.6. Acide glutamique + Glutamine/Histidine.....181

1.3.1.7. Valine/Leucine 183

1.3.1.8. Thréonine + Isoleucine/Valine + Leucine 185

1.4. RELATIONS INTER-METABOLIQUES: LIPIDES ET GLUCIDES 188

1.4.1. Les inter-relations métaboliques normales.....188

1.4.1.1. Lipides/Glucides totaux 188

1.4.1.2. Acides gras/Glucose.....189

1.4.1.3. Phospholipides/Tréhalose 191

1.5. RELATIONS INTER-METABOLIQUES: AMINOACIDES ET GLUCIDES.....194

1.5.1. Les inter-relations métaboliques normales.....194

1.5.1.1. Aminoacides/Glucides totaux 194

1.5.1.2. Acide glutamique + Glutamine/Glucose.....195

PAGES

1.5.1.3. Acide glutamique + Glutamine/Tréhalose.....197
1.5.1.4. Lysine/Glucide Y4.....199
1.5.1.5. Alanine/Glucide Y4 200
1.6. RELATIONS INTER-METABOLIQUES: LIPIDES ET AMINOACIDES.....202
1.6.1. Les inter-relations métaboliques normales.....202
1.6.1.1. Lipides/aminoacides totaux.....203
1.6.1.2. Acides gras/Histidine.....203
1.6.1.3. Phospholipides/Arginine.....205
1.6.1.4. Phospholipides/Asparagine.....206
1.6.1.5. Phospholipides/Sérine.....209

CHAPITRE 2: EFFETS DES DIFFERENTES DOSES DE TOXINE DU B.t.i. SUR LES INTER-RELATIONS METABOLIQUES NORMALES DANS LES LARVES INTOXIQUEES.....212
2.1. RELATIONS INTRA-GLUCIDIQUES.....212
2.1.1. Tréhalose/Glucose.....212
2.2. RELATIONS INTRA-LIPIDIQUES.....216
2.3. RELATIONS INTRA-AMINOACIDES.....217
2.3.1. Les inter-relations métaboliques.....217
2.3.1.1. Glycocolle/Sérine.....217
2.3.1.2. Alanine/Sérine.....222
2.3.1.3. Cystéine/Sérine.....226
2.3.1.4. Cystéine/Thréonine.....229
2.3.1.5. Isoleucine/Thréonine.....234
2.3.1.6. Acide glutamique + Glutamine/Histidine.....237
2.3.1.7. Valine/Leucine.....240

PAGES

2.3.1.8. Thréonine + Isoleucine/Valine + Leucine 245

2.4. RELATIONS INTER-METABOLIQUES: LIPIDES ET GLUCIDES 248

2.4.1. Les inter-relations métaboliques 248

2.4.1.1. Lipides/Glucides totaux 248

2.4.1.2. Acides gras/Glucose 251

2.4.1.3. Phospholipides/Tréhalose 255

2.5. RELATIONS INTER-METABOLIQUES: AMINOACIDES ET GLUCIDES 260

2.5.1. Les inter-relations métaboliques 260

2.5.1.1. Aminoacides/Glucides totaux 260

2.5.1.2. Acide glutamique + Glutamine/Glucose 262

2.5.1.3. Acide glutamique + Glutamine/Tréhalose 265

2.5.1.4. Lysine/Glucide Y4 268

2.5.1.5. Alanine/Glucide Y4 271

2.6 RELATIONS INTER-METABOLIQUES: LIPIDES ET AMINOACIDES 275

2.6.1. Relations inter-métaboliques 275

2.6.1.1. Lipides/Aminoacides totaux 275

2.6.1.2. Acides gras/Histidine 279

2.6.1.3. Phospholipides/Arginine 285

2.6.1.4. Phospholipides/Asparagine 289

2.6.1.5. Phospholipides/Sérine 292

2.7. CONCLUSION 297

CONCLUSIONS GENERALES ET RESUME 302

BIBLIOGRAPHIE

4 - Recherches sur un palliatif hormonal des traumatismes biochimiques provoqués par l'isolement chez l'abeille.

Ce programme constitue le sujet de thèse (nouveau régime) de M. J.P. Jorand, inscrit à l'Université Paris 6 (Jussieu).

Dès 1944, Grassé et Chauvin ont montré que la mortalité de l'abeille est plus élevée lorsque celle-ci est isolée.

Dans certaines conditions, il apparaît maintenant que la mortalité pourrait croître en fonction inverse du nombre d'individus présents dans une enceinte isolée. Il est évident que de tels phénomènes peuvent interférer avec des études toxicologiques faisant appel à des abeilles maintenues en conditions artificielles au laboratoire, d'où la nécessité d'en connaître les mécanismes biochimiques. Mais récemment, R. Chauvin et coll. (1984) ont isolé et identifié les composants actifs d'une substance émise par l'abeille, et dont l'action se traduit par le prolongement de la survie des isolées : la substance a été qualifiée de "survivone" et peut-être assimilée à une forme d'hormone exocrine, c'est-à-dire à une phéromone. Les deux substances actives sont des diacides gras : l'acide azélaïque (C9) et l'acide pimélique (C7).

Les "survivones" sont présentes sur le tégument de l'abeille, ainsi que dans la cire des rayons. Leur origine n'est pas encore connue avec certitude ; elle pourrait se situer au niveau des glandes hypopharyngiennes.

Matériel et Méthodes

La plus importante série expérimentale a été réalisée sur des abeilles d'hiver, dont Arnold pense qu'elles sont les plus sensibles à l'action des survivones. Les analyses ont porté sur plus de 500 individus de race noire locale.

Les abeille sont été prélevées dans la grappe à une heure précise (9h ou 16h), par balayage, puis enfermées en grand nombre (> 50) dans des cagettes. Les divers traitements ont été opérés de la façon suivante :

◊ Echantillonnage

Au temps To, des abeilles prélevées dans la cagette sont isolées dans des sachets de papier fermés comportant un tampon imbibé d'eau pour éviter les traumatismes par dessèchement. Une partie est réservée à l'étude des conséquences de l'isolement ; une autre partie est traitée par les survivones : chaque sachet contient une boule de coton imbibée de 100 µl d'une solution contenant 1 µg/l. de chaque acide, soit µg par individu.

Des lots témoins comportant 8 abeilles groupées dans des sachets de plus grande taille ont également été constitués.

Toutes les abeilles sont maintenues, au cours des expériences, dans une enceinte thermostatée (25°C ou 30°C).

◊ Prélèvements

A partir du temps To compris, des prélèvements d'hémolymphe sont effectués toutes les 3 heures à partir d'échantillons de 8 individus soumis au même traitement. Les thorax et les abdomens sont ensuite détachés et placés au congélateur (-20°C) en vue de l'analyse ultérieure des muscles et du groupe intestin + corps adipeux respectivement.

Les lipides sont extraits par le chloroforme et les glucides par le mélange éthanol-pyridine (4-1). Les analyses sont effectuées par nanochromatographie en couche mince.

◊ Améliorations techniques

La révélation des lipides avait été améliorée par adjonction d'acide sulfurique au mélange acide perchlorique-eau. Un accroissement

de la pénétration du réactif, donc une amélioration de la réaction, à pu être obtenu en dissolvant les acides dans un alcool (méthanol, éthanol ou propanol), lequel constitue un meilleur "vecteur" des réactifs acides que l'eau, dans les "taches" de lipides.

Les dissections des muscles thoraciques et de l'abdomen + corps adipeux sont effectuées sous loupe binoculaire.

Au cours de l'ensemble des opérations, qui ont demandé plus de 6 mois de travail expérimental ininterrompu, 60 plaques chromatographiques ont été utilisées, ce qui représente un travail d'interprétation et de calculs de dosage portant sur 200 chromatogrammes étalons et 400 chromatogrammes échantillons, soit un total de 2500 dosages environ.

Indépendamment des expériences préliminaires destinées à situer le matériel, les diverses répétitions des expériences ont été réparties comme suit :

Tableau 18

13 février	: 20°C	(☾ le 12)	groupées par 8/isolées
20 février	: 20°C	(● le 19)	traitement à 9 h
7 mars	: 30°C	(○ le 7)	traitement à 9 h
14 mars	: 30°C	(☾ le 13)	traitement à 16 h

(La durée des expériences s'étend de 12 à 16 h après traitements)

Les analyses biochimiques s'accompagnent d'une étude des cinétiques de mortalité.

Résultats

L'évolution des concentrations des glucides et des lipides a été déterminée dans l'intestin, site de biosynthèse, dans l'hémolymphe, milieu de transport, et dans les muscles thoraciques, site d'utilisation.

◊ En elle-même, cette partie du travail comporte déjà un apport original, les glucides et les lipides n'ayant jamais été analysés en détails dans les muscles. Les corrélations entre classes biochimiques sont en cours d'étude, dans chacun des 3 compartiments physiologiques.

◊ L'effet de groupe (traumatisme par isolement) a pu être caractérisé sous un angle biochimique jusque là non exploré : les travaux du Professeur Chauvin en avaient fait apparaître des effets respiratoires. Les recherches en cours au Laboratoire de Biochimie en constituent donc le prolongement au niveau des métabolites impliqués comme sources d'énergie.

◊ L'action restauratrice des "survivones" a pu être mise en évidence dans plusieurs cas. Toutefois, le travail de dépouillement des résultats est extrêmement long et devra se poursuivre pendant plusieurs mois encore, en 1986.

◊ Difficultés rencontrées. L'action des "survivones" semble ne pas se manifester n'importe quand : compte tenu du poids considérable de l'expérimentation, il n'était pas possible d'explorer de manière systématique l'ensemble des facteurs influents. Des répétitions ont donc été opérées par "sondages" compte tenu de trois facteurs : le rythme lunaire, dont l'influence a déjà été mise en évidence, le rythme circadien et la température.

Perspectives et conclusions

Au terme du travail en cours, qui constitue le corps de la thèse, il devrait être possible de définir une épreuve rapide de l'action des hormones, de manière à compléter l'étude des facteurs de rythmicité du phénomène. La principale difficulté réside dans le fait qu'il faudra continuer à travailler sur abeilles d'hiver, et que M. Jorand sera appelé au service militaire durant l'hiver 1986-87 ...

Cette première série expérimentale représente déjà deux années de travail particulièrement chargées au terme desquelles il apparaîtra inévitablement des améliorations à apporter, ainsi que des suggestions quant à la manière de poursuivre les recherches. Il s'agit donc ici d'une oeuvre de pionnier, dont le mérite sera non seulement de démontrer la réalité d'un phénomène, à l'échelle biochimique, mais également d'ouvrir de nouvelles voies d'approche : c'est en quoi les points faibles de l'ensemble en constitue en même temps, un acquis tangible, comme point de départ pour d'autres recherches.

La masse d'informations fondamentales relatives à la biochimie de l'abeille, recueillies au cours de ce travail, constituera un apport extrêmement intéressant vis-à-vis des programmes futurs de toxicologie, de sorte que l'ensemble des objectifs initiaux semble devoir être remplis.

REFERENCES

Grassé P.P. et Chauvin R., 1944 - L'effet de groupe et la survie des neutres dans les sociétés animales. Rev. Scient. **7**, 461-464

Chauvin R., Lafarge J.P. et Saligot J.P., 1983 - L'intervention d'une hormone, la survivone, dans la mortalité des abeilles isolées (effet de groupe) chez les abeilles. Note dactylographiée, 13 pp.

Chauvin R., Lafarge J.P. et Saligot J.P., 1984 - Identification chimique des substances de survie des abeilles isolées. C.R. Acad. Sci., sér. III, **299**, 603-606

Chauvin R., 1972 - Sur le mécanisme de l'effet de groupe chez les abeilles. C.R. Acad. Sci., **275 D**, 2395-2398

Chauvin R., 1980 - Sur l'existence probable d'une nouvelle phéromone sociale chez les abeilles. C.R. Acad. Sci., **291 D**, 497-500

Chauvin R., 1981 - Modalités d'action de la "survivone", hormone de survie des abeilles isolées ; sa parenté avec la "phéromone des traces". C.R. Acad. Sci., **293**, séri. III, 723-726

Arnold G., 1976 - Thèse de 3e cycle - Paris

Arnold G., 1978 - Les variations annuelles dans l'effet de groupe chez l'abeille et l'origine de la mort précoce des isolées. Insectes Sociaux, **25**, 39-51

Jorand J.P., 1984 - Recherche des acides pimélique et azélaïque chez l'abeille. Rapport de DEA, Paris 6

7 - Projets de Recherches et Affectations correspondantes.

L'étude des effets "non intentionnels" des pesticides et autres substances xénobiotiques chez l'abeille constitue l'un des objectifs principaux du laboratoire, pour les années à venir.

◊ Sémiologie biochimique comparée des pesticides de différentes classes.

L'étude des cinétiques de variations de la glycémie et de la lipémie, ainsi que des composants de l'intestin/corps adipeux et des muscles, a déjà été entreprise dans le cas de la deltaméthrine. Elle devrait être poursuivie de manière systématique et étendue :

- aux effets comparés de différentes doses
- aux principaux représentants de chaque classe de pesticides

D'autres critères (enzymatiques) devraient y être ajoutés.

La transformation par voie biochimique des pesticides injectés devrait être analysée en parallèle et s'ouvrir d'une part sur les mécanismes d'induction d'enzymes détoxifiantes et d'autre part sur la recherche de la toxicité propre des métabolites des matières actives initiales. Il pourrait en résulter, en effet, de grandes modifications des symptômes toxicologiques primaires, par synergie auto provoquée.

Les altérations biochimiques devraient être suivies jusqu'au stade post mortem en vue de savoir si des analyses d'échantillons prélevés dans la nature permettraient, à partir de critères métaboliques, d'identifier la cause de mortalité, dans des conditions où aucune trace de résidu du toxique ne peut être décelée.

Au cours de ce travail, l'accent serait mis sur les différences entre les symptômes thanatologiques et les manifestations cryptotoxicologiques.

Sur ce programme plusieurs thésards successifs pourraient apporter une contribution substantielle. Il s'agit d'un travail à long terme pouvant justifier le recrutement d'un agent 1B par exemple.

◊ Relations entre toxicologie et pathologie.

Le principe d'une collaboration entre le LBC et la station de pathologie comparée de St-Christol-lès-Alès, dirigée par M. le Prof. Vago a été retenu depuis plus d'un an. L'interaction d'une intoxication sublétale avec le développement de certaines maladies ou parasites constitue, sur le plan pratique, un sujet d'une extrême importance. Il reste à trouver les moyens pratiques de la poursuite, chez l'abeille, du travail déjà engagé dans le cadre de la thèse de M. Niseyimana. La formule du recrutement de boursiers de thèse pourrait apporter de nouveau une solution, au moins temporaire.

◊ Recherches sur l'action des pesticides au niveau de la transmission de l'influx nerveux chez l'abeille.

Ce programme complète les deux volets précédents, permettant ainsi d'ouvrir un éventail très large de recherches sur l'action des pesticides.

Les recherches porteront en premier lieu sur une étude fondamentale du système acétylcholinestérasique de l'abeille (totalement inconnu à l'heure actuelle) puis de l'interaction des pesticides.

M. Luc Belzunces, ingénieur 3A sera affecté au laboratoire à partir de 1986 avec pour mission de développer ce programme. Plusieurs projets de financement ont été proposés, en particulier dans le cadre de la région et celui des AIP-INRA. Le texte en est communiqué ci-après, pour ce qui concerne ces deux cas.

Il sera strictement indispensable dès janvier 1986 d'accroître la surface des locaux du laboratoire. Les demandes déjà réitérées depuis plusieurs années devront se matérialiser d'une manière ou d'une autre, à partir des locaux actuellement inutilisés dans le bâtiment.

Projet de Recherches

Présenté dans le cadre du financement
par le Conseil Général

RECHERCHES TOXICOLOGIQUES POUR LA PROTECTION
DU CHEPTEL APICOLE : élaboration d'épreuves d'innocuité

---

par L. BELZUNCES Ing. 3A : Laboratoire d'Etude des effets non intentionnels des pesticides sur les Pollinisateurs

et M. BOUNIAS Dr. Sc., D.R. : Laboratoire de Biochimie

(Station : AVIGNON-PHYTECO)

Motivations : 1) disparition du cheptel agricole : conséquences préjudiciables pour l'apiculture et le secteur agricole tributaire de la pollinisation. Dans le cas où la pollinisation des cultures fruitières, grainières et légumières ne pourrait plus être assurée, il serait à craindre une chute de production de l'ordre de 80%. L'impact économique de cet aspect du rôle de l'Abeille est actuellement estimé à 30 fois celui des produits de la ruche : même si ce chiffre peut paraître globalement sous estimé, il donne un aperçu du problème tel qu'il se pose en région P.A.C.A., où les vergers fruitiers et les primeurs sont de première importance. (Le problème se pose avec une acuité accrue par l'entrée de l'Espagne et du Portugal dans la C.E.E.).

Depuis quelques années, diverses menaces pèsent gravement sur l'avenir de l'apiculture, se traduisant par d'alarmantes disparitions de cheptel. Dans diverses régions de France, c'est par centaines que les pertes de ruches sont signalées par les Apiculteurs et confirmées par diverses enquêtes auxquelles l'INRA a participé et dont l'ACTA enregistre les données. Le problème acquiert maintenant une nouvelle dimension si l'on ajoute que les populations d'Abeilles européennes sont décimées par un parasite acarien (Varroa jacobsonii) maintenant présent dans notre région. Ce parasite sera d'autant plus difficile à combattre que l'état physiologique du cheptel apicole sera altéré, en particulier par des facteurs toxicologiques.

2) Problèmes toxicologiques. De nombreux rapports et publications auxquels s'ajoutent d'importants procès en cours font ressortir la difficulté, voire même l'impossibilité totale de déterminer les causes d'intoxications et le nombre de cas où il a été possible d'identifier les pesticides responsables des dégâts reste limité.

Depuis 1983 se tient annuellement un symposium international sur l'"harmonisation des méthodes pour tester la toxicité des pesticides chez l"Abeille". Pour l'essentiel, ces méthodes consistent à déterminer les DL_{50}* après application des matières actives sur le thorax (administration topique), per os (ingestion), plus rarement par contact tarsique ou encore par inhalations. Des expérimentations en grandeur réelle sont également pratiquées, soit en plein champ, soit sous tunnels grillagés. Les résultats de ces essais constituent la base des dossiers présentés par les firmes du secteur phytosanitaire pour obtenir l'homologation. Or l'interprétation des résultats obtenus par de telles méthodes reste tributaire de divers facteurs d'incertitude : ainsi, le temps au bout duquel est estimé la mortalité n'est pas défini de manière à tenir compte des variations inhérentes aux divers modes d'action possibles des produits. D'autre part, la DL_{50} n'est pas une épreuve d'innocuité : or celle-ci en est généralement déduite par de simples extrapolations dont la légitimité n'est pas démontrée. Enfin, les essais de terrain, très coûteux et très "lourds", sont assujettis à de nombreux facteurs extérieurs non contrôlables et conduisent le plus souvent à des résultats difficilement interprétables, en particulier du fait de leur manque de reproductibilité.

Objectif. Notre but est de tenter d'appliquer à l'Abeille certains principes de toxicologie clinique déjà en vigueur depuis longtemps chez les mammifères. En effet, malgré l'énorme contraste de taille et de morphologie que présentent l'Abeille et l'Homme, il a été récemment démontré que de très grandes analogies n'en existent pas moins entre ces deux organismes à l'échelle des mécanismes biochimiques de régulation du mé-

* Dose entraînant la mort de 50% des individus au bout d'un délai à préciser (usuellement 24 à 48 h).

tabolisme cellulaire. Il paraît donc indispensable de développer des méthodes d'étude de l'impact des substances toxiques sur les principales fonctions physiologiques de l'organisme, à l'échelle moléculaire. Les résultats de ces recherches devraient servir de base à la mise au point d'épreuves de toxicité rapides, peu onéreuses et fiables. Une partie de ces "tests" sera, en outre, orientée vers la recherche des mécanismes de résistance développés par l'Abeille.

Description des Recherches. Le projet ci-dessous constitue la première phase d'un programme d'ensemble dont la réalisation ne peut être envisagée qu'à long terme. Les recherches porteront sur trois domaines définis :

a) mobilisation des ressources énergétiques internes (glucides, lipides)

b) propagation de l'influx nerveux

c) mise en oeuvre de mécanismes de détoxification

A l'issue de cette première phase, les résultats seront appliqués à l'évaluation directe de l'innocuité comparée des pesticides les plus employés sur les cultures les plus caractéristiques de la région P.A.C.A. .

Durée et Collaborations. Une durée de 2 ans est prévue pour la réalisation de la 1ère phase des travaux décrite dans le chapitre précédent. Le groupe composé du laboratoire de Biochimie (Dr. M. BOUNIAS) et du laboratoire d'Etude des Effets non Intentionnels des pesticides sur les Pollinisateurs (L. BELZUNCES) s'attachera la collaboration de la Profession, en particulier le CIVAM Apicole du Luberon et des Alpes du Sud, représenté par son responsable, M. G. CARRETIER.

Aide demandée.

◊ Nature du Matériel - 1 alimentation très haute-tension pour iso-focalisation électrique des protéines - coût : ..... 30.000 F.

1 spectrophotomètre U.V.-visible enregistreur double faisceau pour analyse spectrale et cinétique - coût : 70.000 F.

1 loupe binoculaire ..... 15.000 F.

◊ Fonctionnement - (réactifs et verrerie spécialisée) .... 15.000 F.

Références

1 - Documents justificatifs :

- International Commission of Bee Botany : Symposium on the harmonisation of methods for testing the toxicity of pesticides to bees. September 23-25, 1980, Wageningen, The Netherlands (Report of meeting).

- International Commission of Bee Botany : Third Symposium on the harmonisation of methods for testing the toxicity of pesticides to bees. March 18-21, 1985, Rothamsted Experimental Station, England (Recommendations for harmonisation of methods for testing hazard of pesticides to honeybees).

- Compte rendu de la réunion du 10 décembre 1984 tenue à la Station de Zoologie, Centre de Recherche Agronomique d'Avignon. Etaient représentés : les Commissions Cheptel et Recherche du Syndicat des Producteurs de Miel Français (S.P.M.F.), l'I.N.R.A. et le Laboratoire National de Pathologie des Petits Ruminants et des Abeilles de Nice (L.N.P.P.R.A.).

- Compte rendu de la réunion du groupe de travail : "Traitements Phytosanitaires et Protection des Abeilles du 6 mars 1985 (A.C.T.A. Paris). Etaient représentés : ACTA, ITAPI, LNPPRA, SPV (Organismes officiels), UIPP, SPMF, Procida (organismes privés).

- Protocoles d'expérimentation Abeilles 1984 (ACTA, INRA, ITAPI, LNPA), rapporteurs F. SEVERIN (ACTA) et M. TISSEUR. Février 1984.

2 - Publications :

- BOUNIAS M. & PACHECO H. - 1979 - Sensibilité de la glycémie de l'Abeille à l'action de l'insuline et du glucagon injectés in vivo. **C.R. Acad. Sci., 289D,** 201-204

- BOUNIAS M. - 1980 - In vivo control of haemolymph α-glucosidase kinetics by glycemic components, according to developmental stages of Apis mellifica (Hymenoptera-Insecta). **Comp. Biochem. Physiol. 66B**(3), 335-341.

- BOUNIAS M. - 1980 - N(1-naphtyl) ethylenediammonium dichloride as a new reagent for nano-quantification of glucids on thin-layer plates by a mathematical calibration process. **Analytical Biochemistry 106**, 291-295.

- BOUNIAS M. & MORGAN M.R.J. - 1981 - An in vitro kinetic study of the mixed inhibition of Honeybee haemolymph pNP-α-D-glucosidase by sucrose. **Experientia 37,** 1147-1148.

- BOUNIAS M. - 1982 - Kinetic study of the inhibition of the Honeybee haemolymph α-glucosidase in vitro by BAYe 4609, BAYg 5421 and BAYn 5595. **Biochemical Pharmacology 31**(17), 2769-2775.

- BOUNIAS M. & MORGAN M.R.J. - 1984 - Adaptation of Honeybee haemolynph α-glucosidase to changing physiological requirements by transitions in the Hill coefficient **Int. J. Biochem. (G.B.) 16**(8), 939-941.

- BOUNIAS M., DUJIN N. & POPESKOVIC D. - 1984 - Effects of sublethal doses of a synthetic pyrethroid : deltamethrin, on the glycemia, the lipemia and the gut alk. phosphatases of the Honeybee. **Pestic. Biochem. Physiol. 24**(2), 149-160.

- BOUNIAS M., MOREAU R. & GOURDOUX L. - 1985 - Une inter-relation entre glucose et acides gras, induite dans l'hémolymphe d'Abeilles par l'injection d'insuline spécifique et supprimée par la somatostatine de vertébrés. **C.R. Acad. Sci. (Paris), série III, 300**(17), 623-626.

PROJET DE RECHERCHES

Présenté dans le cadre A.I.P.-INRA

Par : L. BELZUNCES et M. BOUNIAS

(Station de Phytopharmacie et Ecotoxicologie
d'Avignon : LABORATOIRE DE BIOCHIMIE)

Le projet suivant s'inscrit dans le 3e des objectifs prioritaires définis dans le document relatif à la programmation de la Recherche au Département de Phytopharmacie et Ecotoxicologie :

"Apprécier les risques toxicologiques à court, moyen et long terme induits par les produits agro-pharmaceutiques sur les espèces animales domestiques et sauvages".

Il figure au titre de 3e programme sous la mention suivante :

"Appréciation des effets non intentionnels des pesticides sur les organismes auxiliaires de l'agriculture".

TITRE DU PROJET GENERAL

Interaction des pesticides avec la transmission synaptique chez l'Abeille.

TITRE DE L'ACTION PRESENTEE

Analyse du système acétyl-cholinestérasique de l'Abeille

Présentation du sujet

Parmi les substances toxiques utilisées en agriculture, nombreuses sont celles qui agissent sur le système nerveux, qu'il s'agisse de la transmission de l'influx le long des neurones, ou du fonctionnnement de la plaque motrice à la jonction neuro-musculaire.

Dans tout dossier de demande d'homologation devrait donc figurer une description précise de l'action du produit sur les acétyl-cholinestérases (AChE) des Vertébrés (en particulier l'homme et le rat) ainsi que sur celles des Insectes auxiliaires dont la Loi impose la protection, et plus précisément de l'**Abeille.** Il est d'autant plus important de déterminer l'action sur l'acétylcholinesterase des produits soumis à autorisation d'emploi, que les inhibiteurs de ce neuro-médiateur sont extrêmement dangereux et même le plus souvent mortels.

Difficultés inhérentes au modèle.

Actuellement, dans la plupart des travaux présentés sur ce sujet, les dosages ne portent pas véritablement sur l'acétylcholinestérase elle-même, mais sur un grand nombre de pseudo-cholinestérases regroupées sous le terme général de "cholinestérases" (ChE). Or, la distinction entre AChE et ChE constitue un objectif critique, car si l'AChE est impliquée dans la transmission de l'influx nerveux, les ChE, quant à elles, ne le sont pas ! Ces pseudo-Cholinestérases (ChE), essentiellement représentées par des carboxylestérases non spécifiques de l'acétylcholine, qui contaminent les préparations d'AChE, sont malheureusement les plus abondantes : leur activité masque donc, très souvent, celle de l'AChE[1-2-4].

Objectifs prioritaires à court terme.

Il apparaît donc comme une nécessité absolue de développer une méthode permettant de distinguer l'AChE des autres formes et de la doser de manière aussi spécifique que possible, sous peine de risquer de ne

pouvoir mettre en évidence l'activité de molécules nocives.

A titre d'exemple, l'un des inhibiteurs connus de l'AChE, le di-isopropylfluorophosphate (DFP)[3], se trouve être aussi, en même temps, un puissant inhibiteur des ChE, en réagissant avec les résidus sérine présents dans le site actif de la plupart d'entre elles. La mise en évidence des propriétés inhibitrices du DFP s'en est donc trouvée facilitée. En revanche, lorsque l'activité d'autres inhibiteurs qui sont -eux- spécifiques de l'AChE est analysée sur des préparations d'extraits bruts, comme c'est le cas dans la plupart des épreuves toxicologiques courantes, les variations d'activités peuvent être si faibles qu'elles passent inaperçues et invalident la signification des tests.

Particularités du modèle

Les propriétés des molécules d'acétylcholinestérase sont principalement étudiées chez les Vertébrés. Il s'agit d'un système enzymatique particulièrement hétérogène, qu'il s'agisse de sa localisation cellulaire, de ses formes moléculaires ou de son polymorphisme apparent. Les molécules se répartissent en formes globulaires ou en complexes liés, dits "asymétriques", comprenant, en sous classes, des formes solubles et des formes membranaires extractibles par des détergents [1-2-4].

Les connaissances fondamentales actuelles sur l'AChE des Insectes sont extrêmement limitées [5] et celles relatives à l'Abeille paraissent quasiment nulles. Il est donc impératif, dans un premier stade, d'analyser de manière aussi complète que possible les systèmes AChE de l'Abeille, en vue d'élaborer, ensuite, des tests destinés à évaluer de manière fiable, la toxicité des produits agrophytopharmaceutiques.

Références bibliographiques

(1) - J. MASSOULIE et S. BON, 1982 - Ann. Rev. Neuro Sci., 5, 57-106

(2) - J. MASSOULIE, 1980 - Trends Biochem. Sci., June 1980, 160-164

(3) - A. GALLI et al., 1985 - J. Pharm. Pharmacol., 37(1), 42-48

(4) - A.R. MAIN, 1983 - J. Environ. Sci. Health, B18(1), 29-63

(5) - A.P. BRESTKIN et al., 1985 - Insect Biochem., 15(2), 309-314

PROGRAMME EXPERIMENTAL

Le programme comporte donc successivement : la mise en évidence, la caractérisation et la purification de l'acétylcholinestérase d'Abeilles. Il devrait conduire, ensuite, à des applications au dosage des AChE spécifiques, puis à l'étude du mode d'action des substances agro-phytopharmaceutiques. Il n'est pas exclu, cependant, que des épreuves de sondage de l'activité toxique de divers pesticides puissent être tentées dès les premières étapes des recherches.

Phases successives des recherches

1 - Détection de l'activité cholinestérasique dans le cerveau d'Abeilles et détermination préliminaire des paramètres cinétiques sur des extraits bruts.

2 - Séparation des différentes formes moléculaires par les techniques suivantes :

◊ Chromatographie d'affinité et ultracentrifugation, pour les formes membranaires.

◊ Chromatographie d'exclusion pour les formes stables

◊ Contrôles par électrophorèse

3 - Caractérisation des structures moléculaires, par électrophorèse en conditions dénaturantes et non dénaturantes :

◊ Mise en évidence des monomères et recherche de la présence

de ponts disulfures dans la structure quaternaire.

◊ Organisation tertiaire et quaternaire de l'enzyme.

4 - Analyse comparée des paramètres cinétiques des formes moléculaires isolées et localisées

5 - Purification et détermination des propriétés spécifiques des formes isolées. Etude de leur rôle physiologique

6 - Mise au point d'un protocole simple permettant l'analyse rapide de l'action des pesticides sur un matériel de structure connue mais **interprétable.**

Des sondages préliminaires pourront être effectués à chacune des étapes du projet.

Calendrier des Travaux

Sous réserve que les équipements nécessaires soient disponibles en temps voulu, les échéances suivantes pourraient être raisonnablement envisagées.

Etapes n°1, 2 et partiellement 3 : 1 an

Etapes n°4 et 5 : 1 an

Etape n° 6 : à partir de la 3e année

Collaborations extérieures

- Pour l'aspect "analytique" : Faculté de Médecine de Marseille, Secteur Nord : laboratoire de Biochimie
- Pour l'aspect "fractionnement cellulaire" : Faculté des Sciences d'Avignon.
- Pour l'aspect "Relations avec la Profession" : inventaire des problèmes posés sur le terrain, fourniture de ruches, etc ... : CIVAM apicoles de la Provence et des Alpes du Sud.

MOYENS DEMANDES

1° Equipement

Phase concernée	Désignation du matériel	Coût actuel indicatif
1-2-3-4-5	Spectrophotomètre enregistreur double faisceau avec microcuves thermostatables	80.000 F.
2-3	Cuve d'électrophorèse sur plaques	10.000 F.
2-3	Générateur 0 à 3000 V	20.000 F.
2-3	Sécheur de gel	10.000 F.
2-4	Collecteur de fractions avec têtes de comptage	20.000 F.
2-4	Pompe péristaltique 10 galets	10.000 F.
4-5	Ultra centrifugeuse micro capacité	80.000 F.
	Total équipement	230.000 F.

2° Fonctionnement

Produits et accessoires de mise en route pour chromatographie et électrophorèse 20.000 F.

Total général : 250.000 F.

Fiche signalétique du projet : sur feuille jointe en annexe

DÉPARTEMENT

FICHE SIGNALÉTIQUE

Titre : Interaction des pesticides avec la transmission synaptique chez l'Abeille
sous titre : Analyse du système acétyl-cholinestérasique de l'Abeille

Mots clés (5 à 10) Acétylcholine - Acétylcholine estérase - Abeille - Pesticides

Titre en anglais : Pesticide interaction with the synaptic transmission in the honeybee
subtitle : Study of the honeybee acetyl-cholinesterase system

Participants I.N.R.A. *(responsable souligné)*	Station *(éventuellement lieu d'exécution)*	Financement extérieur *(partiel ou total)*
L. BELZUNCES M. BOUNIAS	Phytopharmacie et ecotoxicologie CENTRE : AVIGNON Laboratoire de Biochimie Directeur : du laboratoire : Dr. M. BOUNIAS	- origine - - montant - dont crédits M.O.O. :

Année de départ	Durée prévue	Année d'Arrêt

OBJECTIFS : Appréciation des risques toxicologiques à court, moyen et long terme induits par les produits agropharmaceutiques sur les espèces animales domestiques et sauvages (3e objectif). Cas particulier de l'étude des effets non-intentionnels des pesticides sur un auxiliaire de l'agriculture : l'Abeille (3e programme)

Modèle biochimique : transmission synaptique de l'influx nerveux ; étude préalable du fonctionnement du système acétyl-cholinestérasique, avant applications à l'étude du mode d'action des pesticides

POSSIBILITÉS DE VALORISATION DES RÉSULTATS :
(notamment dépôt éventuel de brevet, savoir-faire, publications, . . .)

Mise au point de méthodes d'épreuve de l'activité des pesticides en vue de leur application à l'établissement des dossiers d'homologation (savoir faire, brevets) Publication des résultats fondamentaux ainsi que des tests (sauf en cas de brevets).

COOPÉRATION *(extérieur à l'I.N.R.A.)*

I – EXPÉRIMENTATION EN COMMUN

OUI [X] NON [ ] PARTENAIRES : .Faculté .de Médecine de Marseille,. Secteur. Nord. :. labora-. . toire de Biochimie . . . . . .Faculté .des Sciences. d'Avignon. :. Physiologie. cellulaire. . .

II – ECHANGES RÉGULIERS ET RÉPÉTÉS D'INFORMATIONS

Avec quels laboratoires? .CIVAM .Apicoles .Provence et Alpes. du. Sud. (relations. avec. la. Profes-. . . sion. .Inventaire .des. problèmes. de. terrain. . Fourniture. de. ruches. . . . . .

AVIS DU CHEF DE DÉPARTEMENT :

Projet de Recherches/Jumelage

Déposé dans le cadre d'un appel d'offres de la CEE

Participants :

1 - Biochimie INRA-Avignon (Dr. M. Bounias)

2 - Enzymologie, Université de Lancaster (GB) (Dr. M.R.J. Morgan)

3 - CIVAM Apicole (M. Carretier)

Titre du projet : "Progamme de collaboration sur la Biochimie de l'Abeille : travaux préparatoires à des recherches sur la protection toxicologique des auxiliaires de l'agriculture".

I.6. DESCRIPTION DETAILLEE DU PROJET

Position du Problème - La pollinisation des cultures légumières fruitières et grainières par les insectes constitue l'un des facteurs essentiels conditionnant les récoltes en régularité, quantité et même qualité de production. L'abeille (Apis mellifera L.) est le seul auxiliaire sur lequel l'agriculture puisse compter avec certitude, grâce à son élevage de masse en rûchers pouvant être mis à la disposition des agriculteurs par les apiculteurs. De très importants progrès ont été récemment enregistrés grâce à la pratique de la pollinisation croisée avec introduction de ruches dans les cultures. Malheureusement, à côté des cas d'intoxications flagrantes de rûchers par l'action de pesticides employés à proximité, il se dessine actuellement un phénomène plus insidieux et de ce fait, d'autant plus dangereux : la dépopulation progressive des rûchers surtout en zones de plaines cultivées qui conduit à une disparition du cheptel sans que des causes évidentes puissent être invoquées (d'importants procès en résultent, d'ailleurs, entre l'agriculture et l'industrie). D'autre part, le nourrissement artificiel des Abeilles constitue, par lui-même un problème dont l'importance est aggravée par cette situation de dépérissement.

Orientation des Recherches - Une série de travaux fondamentaux antérieurs a montré que l'Abeille possède des mécanismes enzymatiques et hormonaux de contrôle de la glycémie (BOUNIAS, 1975 à 1985) et que celle-ci est l'un des éléments qui conditionnent la productivité des colonies (BOUNIAS, 1981). L'étude des facteurs biochimiques de l'homéostasie nous paraît donc constituer une base de Recherche particulièrement indiquée en vue de procéder à l'étude des facteurs thanatogènes agissant de manière cryptique, sans que des concentrations notables de substances toxiques puissent être retrouvées dans les insectes recueillis après leur mort.

Parmi les Recherches entreprises depuis 1980 en collaboration avec le DR. MORGAN, de l'Université de Lancaster (G.B.) figurent l'analyse des mécanismes d'inductibilité des α-glucosidases par les substrats naturels ou artificiels, ainsi que l'étude des paramètres phosphatasiques et glycémiques en relation avec la productivité.

Justifications scientifiques et appliquées - L'inductibilité des α-glucosidases est l'un des mécanismes essentiels régissant la libération du glucose, source d'énergie, dans l'hémolymphe de l'insecte.

La moindre altération de ce mécanisme, sous l'action de facteurs extérieurs, peut donc se répercuter de manière préjudiciable, soit en privant l'abeille de l'apport nécessaire d'énergie au cours de son travail de butinage, soit en compromettant l'efficacité nutritionnelle des compléments qui lui sont apportés par les apiculteurs dans des périodes difficiles (en début de printemps, au démarrage du couvain, par exemple).

Les relations entre la glycémie et la productivité ont été analysées chez les abeilles adultes butineuses de diverses races. Nous envisageons de vérifier maintenant la possibilité de prévoir la capacité future de travail d'une ruche en analysant la glycémie des abeilles naissantes. Les conséquences pourraient être importantes quant à la

sélection, pour laquelle l'apiculture professionnelle ne disposait jusqu'ici d'aucun critère.

Enfin, les phosphatases ont une valeur sémiologique très importante, et leur étude présente, de ce fait, un intérêt immédiat dans le domaine traumatologique.

Organisation des Recherches - La plupart des expérimentations biochimiques sont en cours de réalisation au Laboratoire de Biochimie d'Avignon où le DR. MORGAN a déjà effectué deux séjours de "Recherche sabbatique", en 1980 et 1983. Toutefois, une recherche concertée se poursuit également par voie épistolaire, en particulier dans le domaine de la détermination des paramètres enzymatiques non michaëliens par méthodes itératives à l'aide d'ordinateurs. Cette partie est plus particulièrement conduite par le DR. MORGAN qui devrait pouvoir s'équiper d'un ordinateur transportable d'une capacité voisine de 64K. Des séjours de courte durée (10 Jours) destinés d'abord à la préparation des travaux puis à l'exploitation des résultats, ainsi que de moyenne durée (1 mois) pour la réalisation en commun d'expériences devraient pouvoir être programmés chaque année. Le laboratoire de biochimie devrait pouvoir être équipé complémentairement d'un fluorimètre pour l'analyse chromatographique de certains composés de type glycoconjugués encore non identifiés. De leur côté les organismes professionnels apicoles (CIVAM) qui souhaitent voir des progrès se réaliser en matière de sélection et de protection toxicopathologique de l'Abeille, auraient besoin, dans le cadre de leurs activités de développement et de pédagogie de s'équiper en matériel de microscopie.

Enfin, au cours des années ultérieures, compte tenu de l'avancement des travaux en cours, une étude de l'interaction des substances agrochimiques les plus largement utilisées avec les mécanismes inductifs des osidases ainsi que les paramètres cinétiques phosphatasiques de l'Abeille devrait être abordée. L'identification de fonctions physiologiques des formes moléculaires éventuellement affectées serait effectuées en dernier lieu par l'analyse cinétique comparée en conditions de compétition de ligands.

Sur le plan pratique, les sommes demandées en "frais de matériel" incluent les échanges par téléphone et par télex, partagés entre Avignon et Lancaster.

Conclusions et perspectives - La collaboration franco-britannique pour laquelle est formulée une demande de jumelage ne constitue pas un simple projet, mais une réalité concrète ayant déja donné lieu à 12 publications scientifiques parues dans 8 revues différentes françaises et étrangères internationales.

La présente demande vise donc à faciliter et officialiser des relations déjà établies et fructueuses, mais rendues difficiles par l'absence de statut et d'aide financière d'aucune sorte.

Il est à remarquer que les recherches en cours ont le double avantage d'explorer un domaine actuellement vierge en matière de Biochimie des Insectes, tout en ouvrant des perspectives directes d'applications en faveur de l'agriculture.

Enfin, la voie biochimique ouvre en matière de toxicologie sublétale, un nouveau potentiel de Recherche susceptible d'éclairer la traumatologie associée de différents facteurs, agrochimiques, pathologiques et climatiques en particulier.

I.7. DESCRIPTION EXPLICITANT L'INTERET DE LA COLLABORATION ENVISAGEE ET LE ROLE IMPARTI A CHAQUE PARTICIPANT DU PROJET

Interêt de la collaboration - Le laboratoire de biochimie est spécialisé dans l'analyse nanoquantitative des composants biochimiques de l'hémolymphe d'Abeilles. Il bénéficie, en outre, d'une implantation géographique lui permettant de disposer d'Abeilles dans de bonnes conditions.

Sous l'angle enzymologique, le laboratoire d'Avignon dispose d'un potentiel orienté vers l'analyse des cinétiques coopératives (non michaëliennes) réalisables à partir de substrats chromogènes xénobiotiques permettant un suivi des réactions en continu. En revanche, le DR. MORGAN est, quant à lui, plutôt spécialisé dans l'étude des cinétiques michaëliennes déterminées à partir de substrats naturels. Les calculs sont opérés à partir de systèmes d'équations du 1er degré au laboratoire d'Avignon, et par l'utilisation de méthodes récurrentes (itératives) à Lancaster. Les partenaires se trouvent donc en situation d'exacte complémentarité.

Enfin, la proximité du siège CIVAM (organismes régionaux de développement et de formation professionnelle) permettra de maintenir un contact étroit entre les chercheurs et la profession, et de diffuser rapidement les résultats des travaux auprès des intéressés.

Rôle imparti à chaque participant et plan d'action - Le laboratoire de biochimie d'Avignon est chargé de l'exécution des protocoles expérimentaux sur Abeilles. Le couvain d'Abeilles etant le plus abordant au début de l'été, une réunion des partenaires devrait avoir lieu chaque année au printemps, pour une mise au point relative aux axes de Recherche et à la méthodologie (durée maximale : 10 jours).

La phase expérimentale proprement dite aurait lieu, en été, avec la participation des deux partenaires scientifiques (durée 1 mois). Au cours de la période suivante, chacun des partenaires procèderait, chacun avec ses propres méthodes, à une première analyse des résultats, puis au minimum une réunion de confrontation devrait avoir lieu à l'automne en vue de la mise au point des données finales.

Le partenaire professionnel procèderait, de son côté, d'une part aux enquêtes de terrain afin de répertorier les difficultés rencontrées par l'apiculture, et d'autre part à des recherches parallèles par les voies classiques (biométrie) ouvertes également sur une activité de formation pédagogique (stages de jeunes apiculteurs) ; il pourrait, en outre, fournir aux partenaires scientifiques le matériel biologique adéquat.

III - BIOCHIMIE PHYTO-SEMIOLOGIQUE

1 - Mécanismes moléculaires associés à la résistance d'une plante-hôte à un pathogène (Modèle Capsicum au Phytophthora).(Travaux en collaboration avec l'Université d'Avignon : Laboratoire de Physiologie et Pathologie Végétales du Professeur Ph. J. Coulomb)

Ce programme abordé depuis plusieurs années se poursuit et devrait s'élargir dans un proche avenir. A court terme, une série de publications devrait être rédigée à partir de données expérimentales recueillies au cours des années précédentes mais non encore interprétées : celles-ci portent sur les modifications de l'appareil photosynthétique en relation avec les amino-acides, au cours de l'infection et de l'induction de résistance, ainsi que sur les mécanismes d'action du tris-O.éthyl-phosphite d'aluminium (EPAL) sur les phosphatases et les ATPases globales.

L'implication des glucides, déjà soulignée en 1983 (Can. J. Bot., **62**, 1036-1043) a été confirmée dans le cas de l'action de l'EPAL, comme l'illustrent les pages suivantes.

1985 FUNGICIDES FOR CROP PROTECTION. BCPC MONOGRAPH NO 31 C8

VARIATIONS DE LA TENEUR EN SUCRES SOLUBLES DANS LES FEUILLES DE PIMENT CAPSICUM ANNUUM INFECTEES PAR PHYTOPHTHORA CAPSICI ET TRAITEES AU PREALABLE PAR LE PHOSETHYL D'ALUMINIUM

R. LORIENT

Laboratoire de Physiologie et Pathologie Végétales, Université d'Avignon Faculté des Sciences, 33, rue Louis Pasteur, 84000 Avignon.

M. BOUNIAS

Laboratoire de Biochimie, I.N.R.A., Montfavet, Avignon.

RESUME

Les variations des teneurs en glucose, fructose et saccharose ont été analysées dans des feuilles de piment de variétés sensible et résistante infectées par Phytophthora capsici, et traitées au préalable par le phoséthyl d'aluminium. Chez la variété sensible, il apparaît qu'un traitement par le phoséthyl d'aluminium suivi d'une contamination entraîne des modifications significatives des teneurs en glucides solubles, celles-ci deviennent alors comparables à celle de la variété résistante. Ces composés glucidiques pourraient être retenus comme un des paramètres caractérisant la résistance des plantes à une maladie fongique.

INTRODUCTION

Les mécanismes qui contribuent à établir la résistance des plantes à un agent pathogène sont variés. La plante est la siège, au cours de l'infection, de nombreuses modifications biochimiques et physiologiques très complexes qui aboutissent dans certains cas à une expression de résistance significative. L'implication des sucres dans la résistance des plantes aux infections n'est pas encore bien connue.

Toutefois, les travaux de Hohl & Stossel (1976), sur la biosynthèse de callose et de cellulose par les cellules hôtes, montrent que ces composés interviennent dans l'épaississement de la paroi et constituent une barrière mécanique pour les hyphes du champignon. Par ailleurs, un certain nombre de sucres et glycopeptides sont connus pour être des inducteurs de résistance (Keen 1975, Albersheim & Valent 1978, Yoshikawa 1978, Smith 1980). D'autre part, des composés phénoliques libres et leurs dérivés glycosylés peuvent être synthétisés par la cellule hôte et avoir une action de type phytoalexines (Stoessl 1982). De plus une augmentation de la teneur en sucres solubles est à l'origine de la formation des précurseurs des composés phénoliques et des phytoalexines (Uritani & Asaki 1980).

Compte tenu de ces résultats, nous avons étudié dans le cadre de l'interaction hôte-parasite : Capsicum annuum - Phytophthora capsici, les variations des teneurs en sucres solubles dans les tissus foliaires des variétés sensibles (Yolo wonder) et résistantes (Phyo 636), soumises à une infection ou traitées, au préalable, par l'apport d'un produit de synthèse : le phoséthyl d'aluminium. En effet, cette matière active systémique stimulerait, par voies chimiques, les réactions de défense de la plante vis-à-vis d'une infection fongique (Bompeix & al 1980, Durand & Sallé 1981).

C8

MATERIELS ET METHODES

Notre matériel végétal : Capsicum annuum, comporte deux variétés respectivement sensible (Yolo Wonder) et résistante (Phyo 636) à un champignon pathogène Phytophthora capsici. Nos expériences sont réalisées sur des plants âgés de deux mois.

Mode d'application du fongicide

Les plantes sont traitées par trois arrosages racinaires au rythme d'un tous les trois jours (Clerjeau & Beyries 1977). La concentration est de 0,4 g par plante et par application. Ce type de traitement, chez la variété sensible, limite significativement la dimension des nécroses. L'inoculation a lieu 24 heures après le dernier traitement.

Inoculation

Elle est réalisée par dépôt sur la face supérieure des feuilles d'une pastille de P. capsici (souche 15 A), cultivée en milieu gélosé.3 jours après inoculation, les échantillons sont prélevés à l'extérieur de la zone nécrosée et soumis au protocole d'extraction des glucides.

Analyse quantitative

L'extraction des glucides à partir de fragments foliaires et leur analyse quantitative en chromatographie, en couche mince, ont été réalisées suivant les techniques de Bounias (1983).

RESULTATS

Différentes fractions glucidiques ont été identifiées à partir de l'analyse chromatographique des extraits de feuilles de piment. L'analyse quantitative a été réalisée sur trois fractions glucidiques majeures : saccharose, glucose, fructose.

Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants. Les moyennes $\bar{X}$ et les écarts types ($S\bar{X}$) sont exprimés en nanomoles par mg de poids frais et donnés pour quatre mesures.

TABLEAU I9

Concentration en saccharose, glucose et fructose dans les feuilles des variétés sensibles et résistantes de C. Annuum, traitées par le phoséthyl d'aluminium.

Glucides		Echantillon sensible		Echantillon résistant	
		Témoin	Traité	Témoin	Traité
Saccharose	$\bar{X}$	0,27	0,31	0,27	0,41
	($S\bar{X}$)	(0,10)	(0,24)	(0,14)	(0,25)
Glucose	$\bar{X}$	1,75	2,49	2,52	3,56
	($S\bar{X}$)	(0,51)	(0,53)	(0,07)	(1,02)
	$\bar{X}$	2,24	2,57	3,38	4,38
	($S\bar{X}$)	(1,33)	(1,53)	(0,84)	(1,77)

On peut constater que le traitement par le phoséthyl d'aluminium ne modifie pas de manière significative les concentrations en saccharose, glucose et fructose dans les feuilles de piment de variété sensible ou résistante.

C8

TABLEAU 2 O

Concentration en saccharose, glucose et fructose, après inoculation, dans les feuilles de piment témoin et traité par le phoséthyl d'aluminium.

Glucides		Echantillon sensible			Echantillon résistant		
		Témoin	Contaminé	Traité Contaminé	Témoin	Contaminé	Traité Contaminé
Saccharose	$\bar{X}$	0,27	0,24	0,56	0,27	0,40	0,72
	($S\bar{X}$)		(0,10)	(0,02)		(0,15)	(0,38)
Glucose	$\bar{X}$	1,75	2,10	3,85	2,52	3,68	3,66
	($S\bar{X}$)		(0,66)	(1,74)		(0,35)	(1,11)
Fructose	$\bar{X}$	2,24	0,76	4,72	3,38	4,35	4,46
	($S\bar{X}$)		(0,23)	(1,38)		(0,62)	(2,47)

A la suite de l'infection , chez les plantes non traitées, les concentrations en saccharose, glucose et fructose augmentent chez la variété résistante et sont plus élevées que chez la variété sensible où on observe une diminution en fructose.

Dans les extraits foliaires issus de piments inoculés, on peut noter, chez la variété sensible traitée, que les teneurs en saccharose, glucose et surtout fructose augmentent par rapport aux échantillons non traités. Le traitement par le phoséthyl d'aluminium ne modifie pas les teneurs en glucides des plantes résistantes contaminées.

DISCUSSION

Les résultats rapportés précédemment montrent que la réserve glucidique soluble des piments de variété sensible et résistante peut être affectée par la contamination.

Chez les plantes résistantes, les concentrations des sucres étudiés s'intensifient. Chez la variété sensible, la teneur en glucose augmente de 20 % mais celle du fructose diminue d'environ 66 %. Ceci pourrait être en relation avec la nutrition carbonnée du pathogène. Chez cette même variété contaminée, le traitement par le phoséthyl d'aluminium entraîne une augmentation considérable de la teneur en glucose et en fructose plus particulièrement, ce qui inverse totalement les effets de la contamination.

Il apparaît ainsi qu'un traitement par le phoséthyl d'aluminium de la variété sensible, suivi d'une inoculation, modifie significativement les teneurs en glucides solubles. Ces concentrations deviennent alors tout à fait comparables à celle de la variété résistante également traitée et contaminée.

Ces composés glucidiques pourraient donc être retenus comme un des paramètres dans la caractérisation de la résistance dont les mécanismes fondamentaux sont encore méconnus. Il constitueraient une des composantes du système dynamique multiple proposé par Bell (1981) et dont dépend la résistance.

C8

Il serait maintenant intéressant d'étudier les photoassimilats et leur migration dans le cas de l'interaction compatible, observée chez la variété sensible, afin de les comparer aux conditions défavorables pour le parasite, d'une part après traitement au phoséthyl d'aluminium et d'autre part dans le cas de la résistance variétale.

VARIATIONS IN SOLUBLE CARBOHYDRATE CONTENT IN CAPSICUM LEAVES (CAPSICUM ANNUUM) TREATED WITH FOSETYL-AL THEN SUBSEQUENTLY INFECTED WITH PHYTOPHTHORA CAPSICI.

Variations in glucose, fructose and sucrose content were analysed in capsicum leaves of sensitive and resistant cultivars infected with Phytophthora capsici. The plants had previously been treated with fosetyl-Al. In the sensitive cultivar, fosetyl-Al treatment followed by inoculation caused significant modifications in soluble carbohydrate content which became similar to those found in the resistant cultivar. These carbohydrate compounds could be used as one of the parameters characterizing plant resistance fo fungal disease.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Albersheim, P.; Valent, B. (1978) Host pathogen interactions in plants. Plants when exposed to oligosaccharides of fungal origin, defend themselves by accumulating antibiotics. Journal of Cell Biology (78), 627-643.

Bompeix, G. ; Ravisé, A. ; Raynal, G. ; Fettouche, F. ; Durand, M.C. (1980) Modalités de l'obtention des nécroses bloquantes sur les feuilles détachées de Tomate par l'action du tris-O-éthyl phosphonate d'aluminium (Phoséthyl d'aluminium), hypothèses sur son mode d'action in vivo. Annales de Phytopathologie, 12, 337-351.

Bounias, M. (1983) Analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince. Masson, 26-33.

Bell, A.A. (1981) Biochemical mechanisms of disease resistance. Annual Review of Plant Physiology, 32, 21-81.

Clerjeau, M. ; Beyries,A. (1977) Etude comparée de l'action préventive et du pouvoir systémique de quelques fongicides nouveaux (Phosphites, Prothiocarbe, Pyroxychlore) sur poivron vis-à-vis de Phytophthora capsici Léon. Phytiatrie - Phytopharmacie,26, 73-84.

Durant, M.C., Salle,G.(1981) Effet du tris-O-éthyl phosphonate d'aluminium sur le couple Lycopersicum esculentum Mill - Phytophthora capsici Léon. Etude cytologique et cytochimique. Agronomie 1(9), 723-732.

Hohl, H.R. ; Stossel, P (1976) Host parasite interfaces in a resistant and a susceptible cultivar of Solarum tuberosum inoculated with Phytophthora infestans : tuber tissue. Canadian Journal of Botany, 54(9),900-912.

Keen, N.T. (1975) Specific elicitors of plant phytoalexin production : determinants of race specificity in pathogens. Science, 187, 75-76.

Smith, I.M. (1980) Phytoalexines. Annales de Phytopathologie, 12,321-328.

Stoessl, A. (1982) Biosynthesis of phytoalexins. In:Phytoalexins, 133-180. Blackie, London, Glasgow.

Uritani, I. ; Asaki, T. (1980) Respiration and related metabolic activity in wounded and infected tissues. In : The Biochemistry of Plants,2, Academic Press, 463-483.

Yoshikawa, M. (1978) Diverse modes of action of biotic and abiotic phytoalexin elicitors. Nature, 275, 546-547.

2 - Mécanismes moléculaires liés à la résistance du Pin sylvestre aux scolytes et aux pathogènes fongiques transmis par l'insecte. (M. Bounias, Mmes B. Frérot*, M.L. Milat, Charpin, M.H. Daurade, M. Lieutier**, Prof. Lévieux**)

* Laboratoire des Médiateurs Chimiques - Brouessy

** Station de Zoologie Forestière, Orléans

Les dégâts causés par les scolytes aux forêts de résineux constituent un sujet assez grave pour avoir justifié l'organisation d'une ATP en 1984. Celle-ci a été reconduite pour 1985 et l'ensemble des travaux se résume comme suit.

A - Etude du "clone Haguenau". Les H5 et H8, multipliés par greffage ont fait l'objet d'une analyse comparée des glucides d'échantillons de liber prélevés à 1 m et à 3 m. En 1984, l'analyse des tiges 1-2-3 du clone H8 était achevée, et celle des tiges 4 et 5 partiellement effectuée. En 1985, l'analyse des tiges 4 et 5 a été parachevée, après résolution d'un problème purement technique (voir §) et celle des tiges 1 à 4 du H5 a été effectuée en totalité.

B - Vigueur apparente sur le "clone Orléans" - Les forestiers ont sélectionné, par appréciation visuelle, 5 brins considérés comme "vigoureux" et 5 autres "non vigoureux". L'analyse comparé des glucides du liber a été réalisée sur 3 brins de chacune des deux catégories.

C - Infestation artificielle - Au cours de 1985 a été opérée une expérimentation destinée à comparer les propriétés biochimiques (glucides, hétérosides, phénols ...) d'échantillons prélevés sur des arbres ayant subi une infestation artificielle par rapport à des témoins.

D - Identification de structures hétérosidiques - Les chromatogrammes font apparaître, parmi les composés glucidiques, des molécules de

faible polarité globale pouvant être constituées d'hétérosides hydro-solubles de faible polarité, (cas relativement rare mais possible). L'une de ces fractions, isolée par chromatographie sur colonne par Mlle Milat et Mme Charpin (Lab. des Médiateurs Chimiques) est en cours d'analyse.

Les principaux résultats obtenus dans chacune des 4 rubriques précédentes sont brièvement exposés dans les pages qui suivent.

A - ETUDE DU CLONE HAGUENAU

A - 1 - Compléments d'étude du H8 - Les résultats portant sur les brins 4 et 5 ont été recalculés pour tenir compte de l'interférence d'artefacts de dosage décelés dans les analyses précédentes (voir chap. III-3). Le tableau 21 présente les données numériques en nmoles par mg.

Tableau 21 - $\overline{x}$ et (Sx) sont donnés pour 2 mesures

brin n°	4		5	
hauteur	1 m	3 m	1 m	3 m
Raffinose	0,85(0,03)	0,79(0,21)	1,27(0,20)	0,94(0,04)
Saccharose	123,2 (15,5)	237,8 (58,3)	136,0 (12,1)	87,6 (2,6)
Glucose	81,6 (32,2)	73,2 (27,4)	67,3 (12,1)	46,9 (0,2)
Fructose	47,1 (8,0)	65,1 (30,2)	74,8 (8,1)	55,7 (2,7)
Xylose*	1,15(0,45)	1,90(0,19)	1,50(0,82)	2,35(2,65)
Rhamnose*	0,47(0,03)	0,14 ...	0,11 ...	0,56(0,64)
Digitoxose*	0,20(0,27)	1,59(0,74)	0,68(0,93)	0,26(0,03)

(*) indique le plus proche étalon.

A partir de ces mesures, les corrélations entre les teneurs respec-

tives à 1 m et à 3 m ont été recalculées pour chaque sucre. Le tableau 22 présente les paramètres obtenus.

Tableau 22 - Corrélations entre concentrations des glucides du liber à 1 m et 3 m comparativement. (b=pente de régression).

	1ère répétition (N=5)		2e répétition (N=5)		Ensemble N=10	
Glucides	ρ	b	ρ	b	ρ	b
Saccharose	0,86	0,73	0,94	0,60	0,88	0,67
Glucose	0,74	0,80	0,93	0,40	0,70	0,76
Fructose	0,94	1,69	0,40	0,31	0,66	0,70

Analyse de variance

Le bilan exprimant les valeurs moyennes des concentrations pour les 5 brins et pour chaque sucre constitue donc un tableau numérique à deux entrées, considérées comme facteurs contrôlés (le n° des grins et l'identification des sucres). Le facteur "brins" comporte KA=5 colonnes et le facteur "sucres" KB=7 lignes. Le calcul fait apparaître les variabilités suivantes :

Q_T = 1.292.169,1 (variabilité totale)

Q_A = 17.082,4 (facteur A)

Q_B = 142.940,61 (facteur B)

Q_E = 14.508,16 (résiduelle)

d'où : F_A = 1,18 : influence non significative (P=0,34)

F_B = 9,85 : influence hautement significative ($P=16.10^{-6}$)

Le résultat était évident, pour F_B (les divers sucres n'ont pas les mêmes concentrations) mais pour F_A, il confirme l'homogénéité des brins du clone, malgré certaines disparités, en particulier au niveau du saccharose.

A - 2 - Etude du H5 - Le tableau 23 présente l'ensemble des données numériques moyennes.

Tableau 23 - Valeurs exprimées en nmoles/mg : $\bar{x}$ (s_x)

Brins	1	2	3	4
Raffinose	0,73(0,42)	1,65(0,16)	1,41(0,62)	1,54(1,07)
Saccharose	80,7 (22,3)	22,8 (1,8)	21,2 (5,4)	19,0 (4,4)
Glucose	24,4 (9,1)	26,1 (7,2)	22,1 (5,6)	21,3 (5,3)
Fructose	50,5 (6,0)	25,6 (6,7)	27,4 (2,6)	26,9 (5,5)
Xylose*	1,2 (1,0)	4,8 (2,4)	2,3 (2,1)	1,3 (1,1)
Rhamnose*	0,22(0,2)	1,9 (2,9)	0,8 (0,8)	1,0 (1,0)
Digitoxose*	0,56(0,7)	43,9 (19,3)	22,0 (14,1)	15,3 (10,5)

(*) plus proche étalon

D'importantes différences apparaissent entre les lots H5 et H8 : dans ce dernier, le groupe constitué par le saccharose, le glucose et le fructose est beaucoup plus concentré que dans le H5.

L'étude des corrélations entre 1 m et 3 m a donné les résultats partiels (N=4) indiqués dans le tableau 24.

Tableau 24 - Corrélations entre les concentrations respectives à 1 m et 3 m - b=pente de régression

Glucides	1ère répétition		2e répétition		Ensemble (N=8)	
	ρ	b	ρ	b	ρ	b
Raffinose	0,12	0,69	0,32	0,39	-	-
Saccharose	0,98	0,88	0,99	0,50	0,94	0,59
Glucose	0,50	0,88	0,10	0,09	+0,37	0,54
Fructose	0,90	0,59	0,92	1,23	0,86	0,84
Xylose	0,99	0,97	-0,64	-3,62	-	-
Rhamnose	-0,59	-2,51	-0,38	-1,01	-	-
Digitoxose	0,84	0,60	0,55	0,29		

L'analyse de variance portant sur les données du tableau 23 à donné (K_A=5 ; K_B=7)

variabilité totale : QT = 10.958,4

facteur A Q_A = 383,06

facteur B Q_B = 5.481,06

résiduelle Q_E = 5.094,91

d'où F_A = 0,45 soit P=0,77

F_B = 4,30 soit P=0,004

Les conclusions sont les mêmes que pour H8.

La comparaison détaillée des séries H5 et H8 devrait faire l'objet d'une première publication, courant 86. Le problème reste de temps à consacrer au travail de rédaction.

B - VIGUEUR "APPARENTE" (CLONE ORLEANS)

Le tableau 25 indique les résultats partiels obtenus en 1985 à partir des arbres considérés "visuellement" comme vigoureux par les agents de l'ONF.

Tableau 25 - Concentrations en nmoles/mg : Arbres d'aspect vigoureux.

brins	1		4		5	
hauteurs	1 m	3 m	1 m	3 m	1 m	3 m
Raffinose	2,48	0,61	0,60	1,44	1,25	1,51
Saccharose	47,4	383,9	516,1	251,5	233,9	2,91
Glucose	31,5	28,8	38,1	16,5	18,7	56,7
Fructose	28,9	32,4	28,8	19,9	19,9	56,9
Xylose*	5,3	1,3	1,8	31,2	30,9	4,3
Rhamnose*	3,0	3,0	1,9	5,2	0,5	4,3
Digitoxose*	-	9,9	11,6	12,4	11,6	-

(*) plus proches étalons

Le tableau 25 fait déjà apparaître d'importantes disparités entre brins, en particulier au niveau du saccharose dont les concentrations varient du simple au décuple.

Le tableau 26 indique les résultats partiels obtenus à partir des extraits prélevés sur des arbres considérés comme peu vigoureux.

Tableau 26 - Concentrations en nmoles/mg. Arbres "peu vigoureux".

brins	1		4		5	
hauteurs	1 m	3 m	1 m	3 m	1 m	3 m
Raffinose	2,25	3,14	1,25	0,72	2,76	3,90
Saccharose	113,8	44,2	436,4	243,0	203,3	273,2
Glucose	44,7	15,8	29,6	20,4	18,5	23,9
Fructose	35,6	20,4	71,9	24,6	24,0	31,3
Xylose*	4,1	3,0	1,3	0,3	0,85	28,1
Rhamnose*	1,85	-	1,87	0,97	0,55	9,32
Digitoxose*	-	-	0,53	4,67	-	-

(*) plus proches étalons

La suite des analyses s'effectuera au cours de 1986, ainsi que l'analyse statistique de comparaison des deux classes d'arbres.

En l'état actuel, rien ne permet de conclure à une coïncidence entre les facteurs glucidiques et l'appréciation visuelle de la vigueur des arbres. Toutefois, au cours de 1966, un inventaire des critères objectifs, (si possible quantitatifs) d'appréciation de la vigueur des arbres sera dressé à la station de Recherches Forestières d'Orléans par M. Lieutier.

C - INFESTATION ARTIFICIELLE.

Des pins sylvestres ont été l'objet d'infestations artificielles à hauteur de 2 m (comprise entre les seuils 1 m et 3 m dont l'analogie a été démontrée au cours des essais précédents) des prélèvements ont été effectués autour de la zone d'infection,siège des reactions de défense de l'arbre, ainsi qu'au point diamétralement opposé, pouvant servir de témoin. Une seconde série de prélèvements était initialement prévue à hauteur différente (à 1 m et à 3 m dans la même ligne de vaisseaux), afin d'analyser la propagation éventuelle des symptômes liés
liés à l'attaque.

Les infections artificielles ont été réalisées avec trois agents :

1) des scolytes

2) des champignons très virulents

3) des champignons peu virulents

Avec les témoins, cela représente 4 traitements et 4 prélèvements par arbre.

Il a été convenu que les essais seraient reproduits en triple répétition :
il s'y ajoute, malheureusement, l'influence de l'époque des manipulations, facteur non négligeable puisque
◊ les champignons les plus virulents sont plutôt inoculés lors des attaques de Mars
◊ les champignons les moins virulents sont plutôt inoculés lors des attaques de Mai.

Le Tableau 27 indique la désignation codique des catégories d'échantillons ainsi que les Nos et nombres de prélèvements : la disposition des prélèvements sur les arbres est illustrée par la fig. 20.

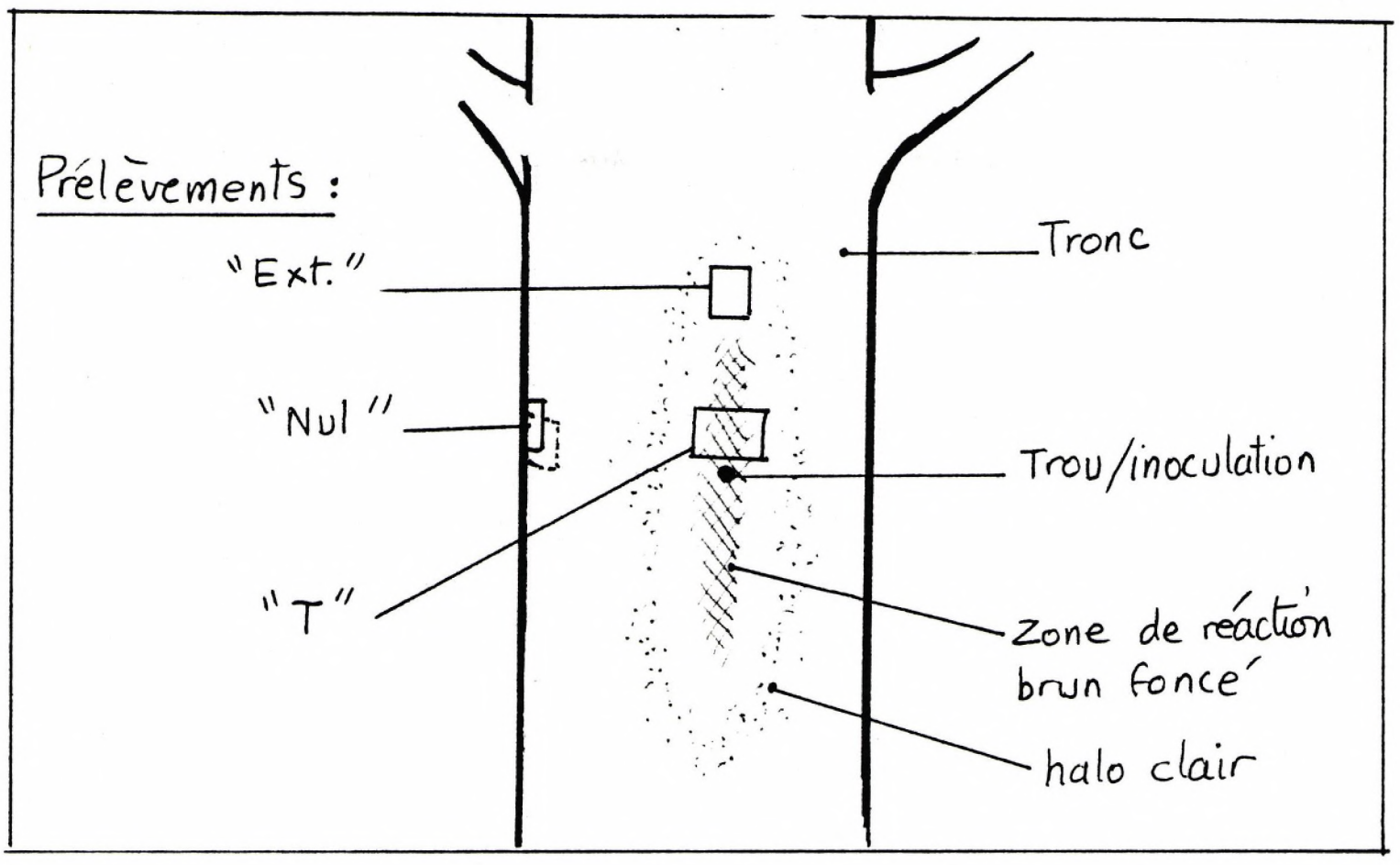


Fig. 20 - Réactions de l'arbre à To + 28 jours et position des prélèvements d'échantillons.

Tableau 27

Code	désignation	Code	désignation
Nul li	Tissus non blessés (liber)	Ext. li	Extérieur de la zone : cas de forte réaction à l'infection
T li	Voisinage du Trou dans le liber		
		Li 2 Ext.	Extérieur : cas de poche de résine
Nul aub.	Aubier non blessé		
T aub.	Voisinage du Trou dans l'aubier		

Nos échantillons : SP 54 à 59, 101 à 106, 63 à 68, 110 à 115, 72 à 77, 119 à 124 pour chaque code

La répartition des prélèvements, en fonction des traitements est indiquée dans le tableau 28.

Tableau 28

Date des traitements	Date des prélèvements	10 Avril	24 Avril
27 mars	Trou seul champignon P1 *T. piniperda*	54-55-56 63-64-65 72-73-74	57-58-59 66-67-68 75-76-77
		14 Mai	21 Mai
7 mai	Trou seul champignon S *I. sexdentatus*	101-102-103 110-111-112 119-120-121	104-105-106 113-114-115 122-123-124

Les échantillons prélevés les 3 avril et 4 juin ne sont pas parvenus au laboratoire. Les autres ont été placés au congélateur et feront l'objet des analyses de glucides libres et hétérosidiques à partir de 1986. L'ensemble représente actuellement 172 échantillons, ce qui correspond à plus de 3000 dosages et demandera donc un temps de travail analytique déjà considérable.

D - IDENTIFICATION DE STRUCTURES HETEROSIDIQUES

Le spectre des glucides recèle des fractions de haute mobilité, c'est-à-dire de faible polarité, dans les conditions analytiques observées.

Par hypothèse, à côté des oses libres de type "polydésoxy" dont la mobilité correspond à celle de ces fractions, il est également possible de trouver certains hétérosides dont l'aglycone présenterait une affinité très faible vis-à-vis de la silice mais suffisamment élevée vis-à-vis du solvant pour accroître, par effet "d'entraînement", la mobilité apparente d'un hexose lié, par exemple. Or, de tels composés peuvent être impliqués dans les mécanismes de résistance des végétaux à des pathogènes[1] et leur étude en relation avec l'attaque des scolytes présente un réel intérêt.

(1) Bounias M., Coulomb Ph. J., Coulomb C., 1983. Can. J. Bot. **62**, 1036-1043

D - 1 - Localisation et isolement des fractions analysées.

La fig. 21 A montre un chromatogramme provenant du clone H8 d'où ont été tirés les extraits. La première étude de structure portera sur une fraction (composite) de mobilité correspondante à celle du digitoxose, dénommée ici "fraction [10+15]".

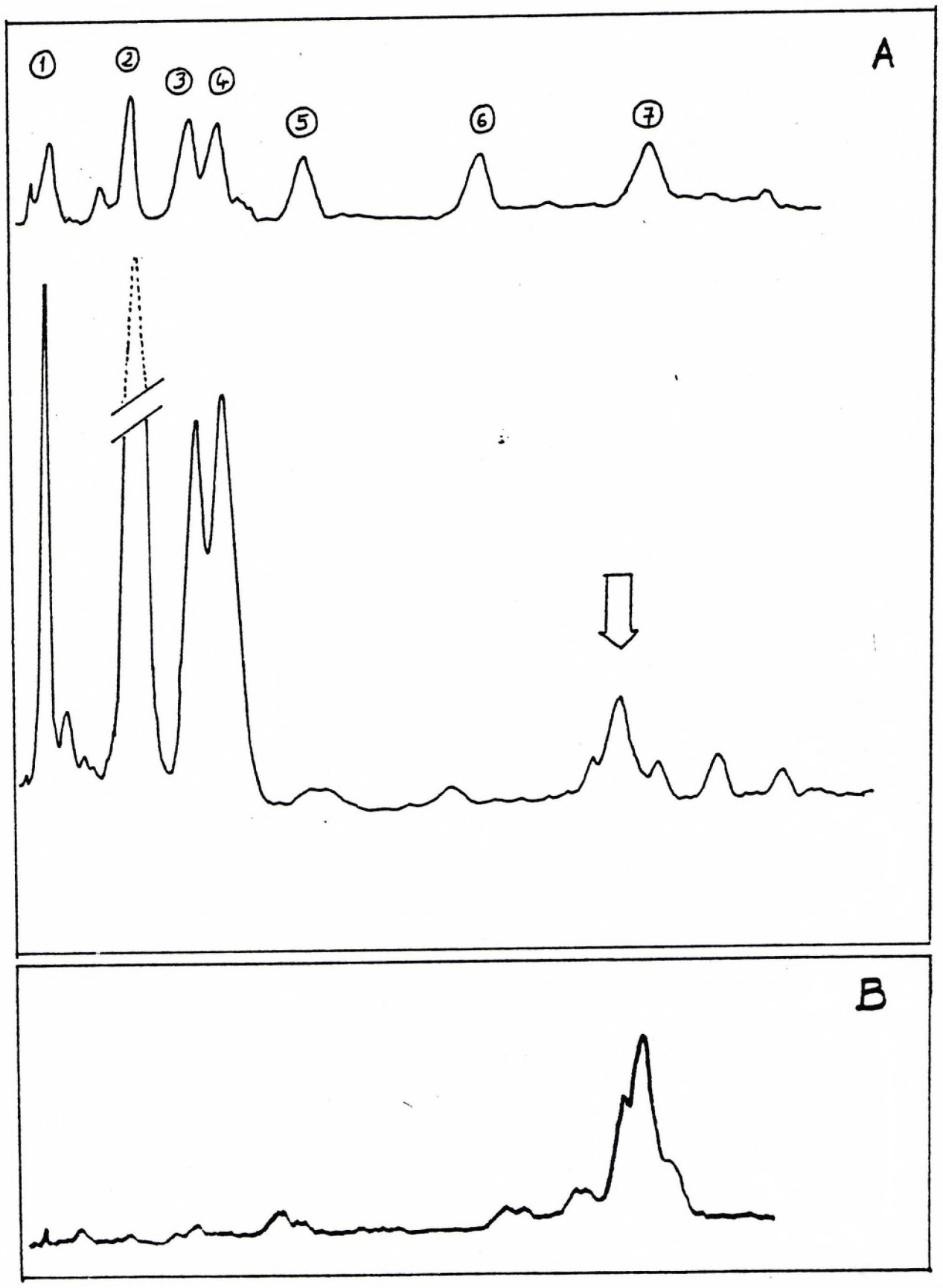


Fig. 21 A - Chromatogramme des glucides d'un extrait de liber du clone H8 de Pins sylvestres. La flèche montre la fraction à analyser. Le chromatogramme du haut situe les étalons : 1 =raffinose ; 2 =saccharose ; 3 =glucose ; 4 =fructose ; 5 =xylose ; 6 =rhamnose ; 7 =digitoxose. B - Fraction [10+15] isolée.

La fig. 21 B présente un chromatogramme CCM obtenu à partir de la fraction isolée par chromatographie sur colonne.

D - 2 - Identification d'une structure hétérosidique.

La fig. 22 illustre les résultats de l'hydrolyse acide de la fraction [10+15]. Les variations quantitatives des divers composants, au cours de 6 h d'hydrolyse par HCl 2N à 50°C, sont indiqués dans le tableau 29.

Tableau 29 - Cinétiques d'hydrolyses (concentrations exprimées en mM) : (8)=glucose ; (9)=fructose ; (9-1)=mobilité légèrement supérieure à celle du Fru ; (17-8), (17-9), (18), (18-1), (18-2) = composants de la fraction [10+15]

	To	30 mn	1 h	2 h	4 h	6 h
8	0,27	2,44	4,74	9,44	13,07	17,95
9	0,65	0,94	0,61	0,49	0,69	0,79
9-1	0,05	0,53	0,57	0,57	0,86	1,28
17-8	1,4	0,63	0,72	-	0,19	0,19
17-9	5,0	7,1	5,1	2,9	4,4	4,0
18	19,0	12,5	11,9	10,6	5,3	2,1
18-1	1,8	1,5	3,4	3,0	2,8	1,8
18-2	0,6	3,1	1,8	1,8	1,5	0,65

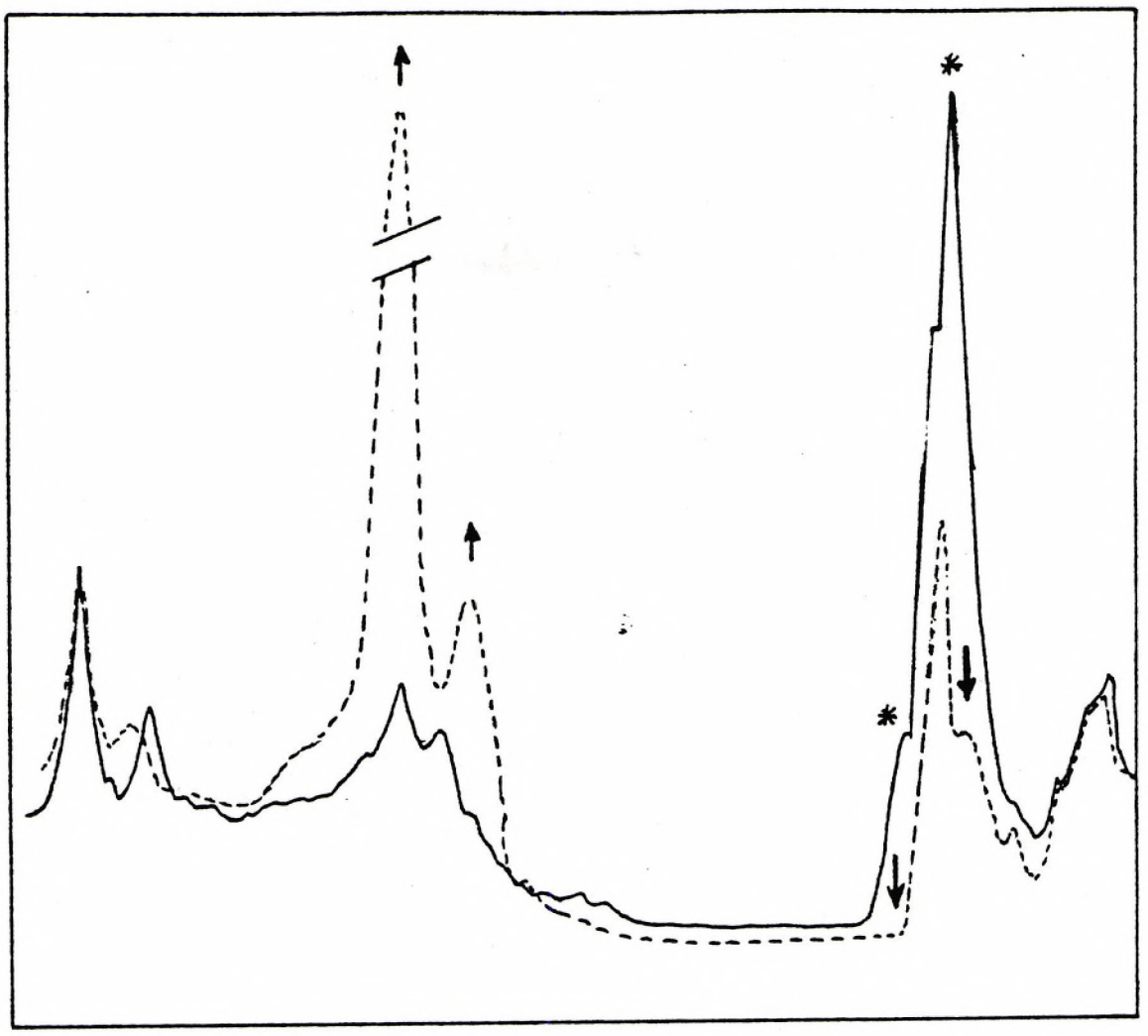


Fig. 22 - Hydrolyse acide de la fraction [10+15] : le spectre initial est présenté en trait plein, et le spectre après hydrolyse, en pointillés.

L'étude des paramètres cinétiques par corrélation/régression permet de décrire le processus d'hydrolyse et d'établir des analogies entre substrats hydrolysés et produits apparus (tableau 30).

Tableau 30 - Relations C=f(t) au cours de l'hydrolyse acide.

Composés :	ρ	pente mM/heure	σ_b
n° 8	0,984*	2,87	0,26
9	0,099	0,007	-
9-1	0,934*	0,164	0,031
17-8	-0,71*	-0,153	0,076
17-9	-0,49	-0,30	-
18	-0,946*	-2,42	0,41
18-1	0,026	0,0087	-
18-2	-0,423	-0,17	-

* corrélations significatives

Il apparaît ainsi une concordance entre les composants n° (8) et (18) d'une part et les composants n° (9-1) et (17-8) d'autre part. Les figures 22 et 23 illustrent les courbes correspondantes.

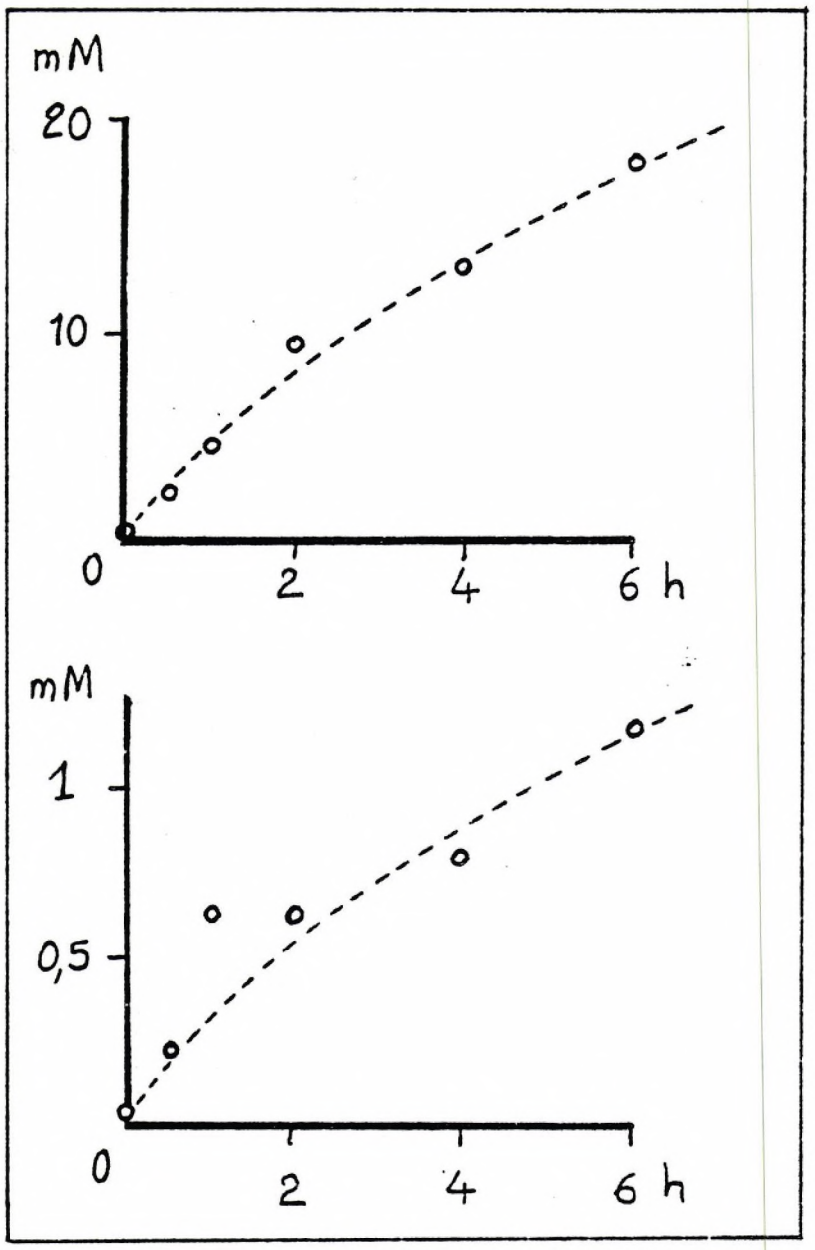


Fig. 23 - Cinétiques d'apparition des composants (8) (graphe du haut) et (9-1) (graphe du bas) par hydrolyse acide de l'extrait "10/15"

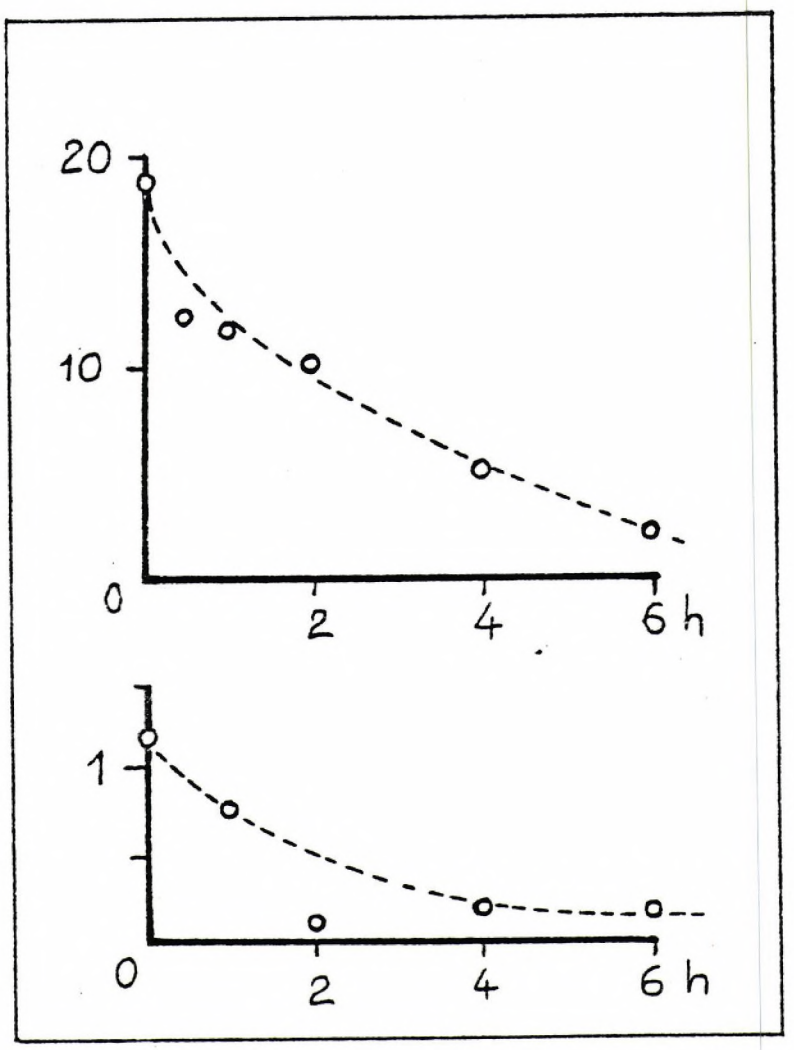


Fig. 24 - Cinétiques d'hydrolyse des composants (18) (graphe du haut) et (17-8) (graphe du bas) dans l'extrait "10/15".

Les corrélations significatives (tableau 30) montrent qu'il y a effectivement cinétique en fonction de la durée d'action de HCl, et l'identité des pentes de régression linéaire en valeurs absolues (à σ_b près) et de signes contraires, suggère, en première approximation, que les composés (8) et (9-1) sont respectivement les produits d'hydrolyse des composés (18) et (17-8).

Les graphes exprimant les variations des concentrations des produits (8) et (9-1) portées en fonction des variations (Co-C) des substrats hypothétiques correspondants, sont sensiblement linéaires (fig. 24) et leurs paramètres de régression sont les suivants :

(8)/(9-1) : $\rho = 0,956$; $b = 1,09$; $\sigma_b = 0,16$

(9-1)/17-8) : $\rho = 0,930$; $b = 0,85$; $\sigma_b = 0,19$

Les pentes ne diffèrent pas significativement de l'unité de sorte qu'il est permis de conclure à la validité de l'identification des couples substrat/produit, et de préciser que les réactions sont monomoléculaires.

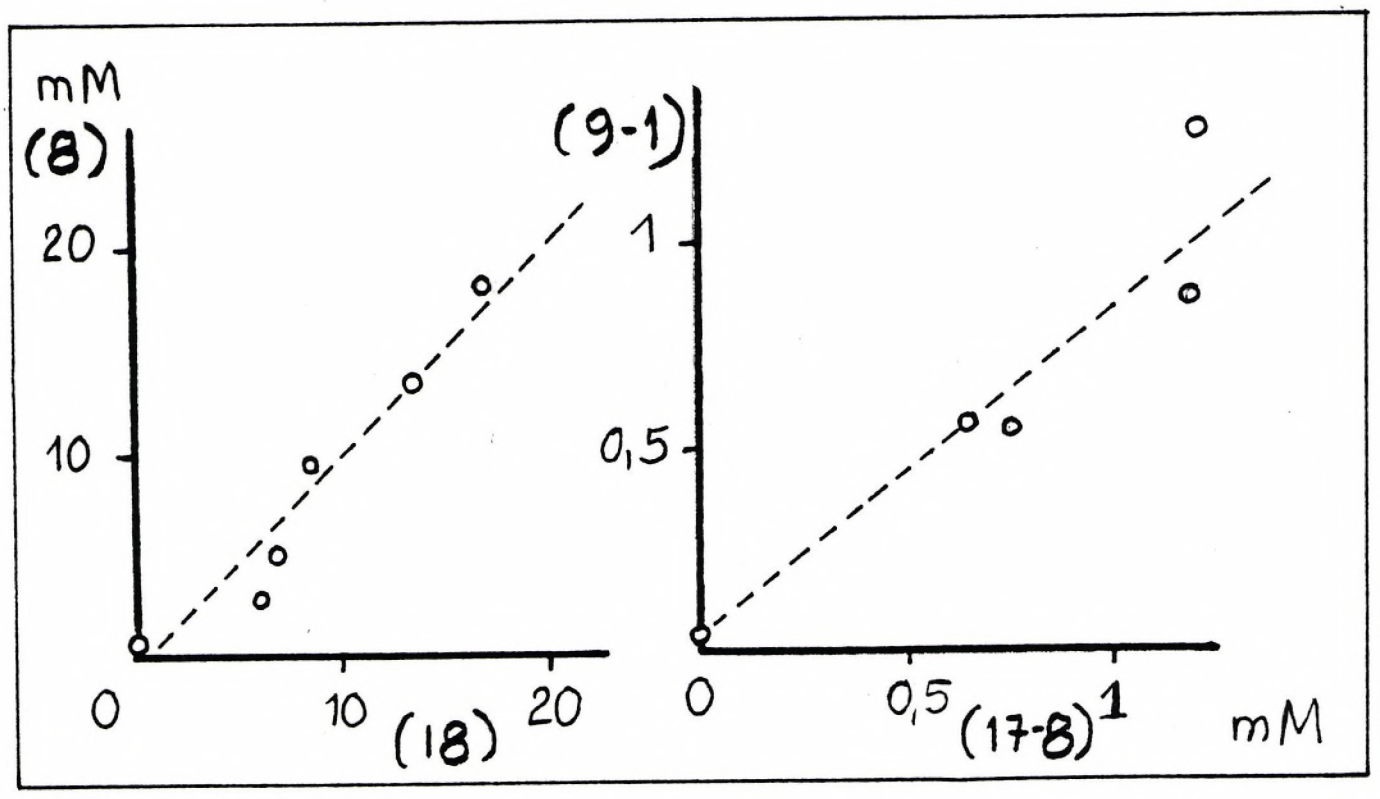


Fig. 25 - Equimolarité des réactions d'hydrolyse des composants (17-8) et (18) de la fraction 10/15.

L'identification des hexoses libérés a été effectuée par chromatographies comparatives à l'aide de 4 systèmes éluants différents :

(I) - Acétonitrile-alcool amylique-eau (60-20-20) : n° 85-172

(II) - n.butanol-méthyl-étyl-cétone-ac. acét.-eau (40-30-10-20):n°85-173

(III) - n.butanol-éthanol-ac.acét.-eau (40-30-10-20) : n° 85-174

(IV) - - n.propanol-eau-pyridine (65-10-25) : n° 85-175

Les propriétés chromatographiques des étalons suivants : glucose, fructose, galactose, mannose, arabinose, sorbose, ont été comparées à celles des deux produits d'hydrolyse numérotés 8 et 9-1 (tableau 31).

Tableau 31 - Identification des produits d'hydrolyse : comparaison des mobilités absolues (mm) dans les 4 systèmes éluants (voir texte). La hauteur moyenne des fronts de solvants est de 130 mm.

oses éluants :	I	II	III	IV
Glucose	21,5	12,5	39,5	30,8
Fructose	25	15,5	42	31,2
Galactose	17,5	11	31,7	22,5
Mannose	23,5	17,5	44,5	34,8
Arabinose	30,5	16,5	43,5	37
Sorbose	26	17,5	44,5	36
x_1	18,5	12,5	36,8	34
x_2	23,5	...	...	40
x_3	29		50	53
x_4	70,5	79,5	89,5	93,5

Le composé (8) semble coïncider plutôt avec le glucose tandis que l'identification du (9-1), voisin de l'arabinose, reste à confirmer.

L'identification du glucose a été précisée de deux manières complémentaires :

a) Comparaison du spectre NEDIAC avec celui de l'étalon.

Pour le composé (9-1) nous observons :

9-1 : λ max=540-550 nm ; λ min=400 et 690 nm

arabinose : λ max=550-560 nm ; λ min=430-440 et 660-670 nm

Pour le composé (8) :

(8) : λ max=530-540 nm ; λ min=400 nm et 670 nm

glucose : λ max=530 nm ; λ min=400 nm et 650-680 nm

(8)+Glc : λ max=530 nm ; λ min=400-410 et 670-680 nm

L'identification du glucose avec (8) est complète ; celle du composé (9-1) reste à préciser.

b) Cochromatographie du glucose étalon et du composé (8) montrant l'identité formelle de mobilité, y compris dans le milieu d'extraction (il arrive parfois que les mobilités soient affectées par certains composés présents dans les milieux biologiques complexes, d'où la nécessité de procéder à cette contre-épreuve). Les résultats sont indiqués dans le tableau 32.

D - 3 - Comparaison des propriétés hydrolytiques de diverses liaisons osidiques.

En préalable à l'étude de la liaison osidique du glucose de l'hétéroside (18), nous avons comparé, dans les mêmes conditions d'hydrolyse que précédemment, le comportement des composés suivants : saccharose (Sacc), gentiobiose (Gen), cellobiose (Cell), palatinose (Pal) et turanose (Tur).

La fig. 25 illustre les résultats d'hydrolyse du palatinose : la disparition $\Delta(Pal)=f(t)$ est décrite par les paramètres : $\rho=-0,992$; $b=-0,247$ mM/h ; et l'apparition des produits (Glc et Fru) par :

Glc : ρ=0,964 ; b=0,065 mM/h

Fru : ρ=0,979 ; b=0,057 mM/h

Tableau 32 - Identification chromatographique du glucose comme produit d'hydrolyse de la fraction [10+15]. Les mobilités absolues sont exprimées en mm ; les hauteurs de fronts sont de 130 mm.

Solvants Eluants :	I	II	III
Glucose étalon ...	10,5	38	19
Composants [8] ...	9	37	21
Superposition Glc + [8] ...	9	37	21

(I) = acétonitrile-alcool amylique-eau (60-20-20 v/v)
(II) = n.butanol-éthanol-ac. acét.-eau (40-30-10-20 v/v)
(III) = n.propanol-eau-pyridine (65-10-25 v/v)

Les écarts de mobilité constatés entre le composant [8] et le glucose étalon sont donc bien dus à la présence, dans l'extrait, de substances qui interagissent avec le glucose et en modifient légèrement les propriétés chromatographiques.

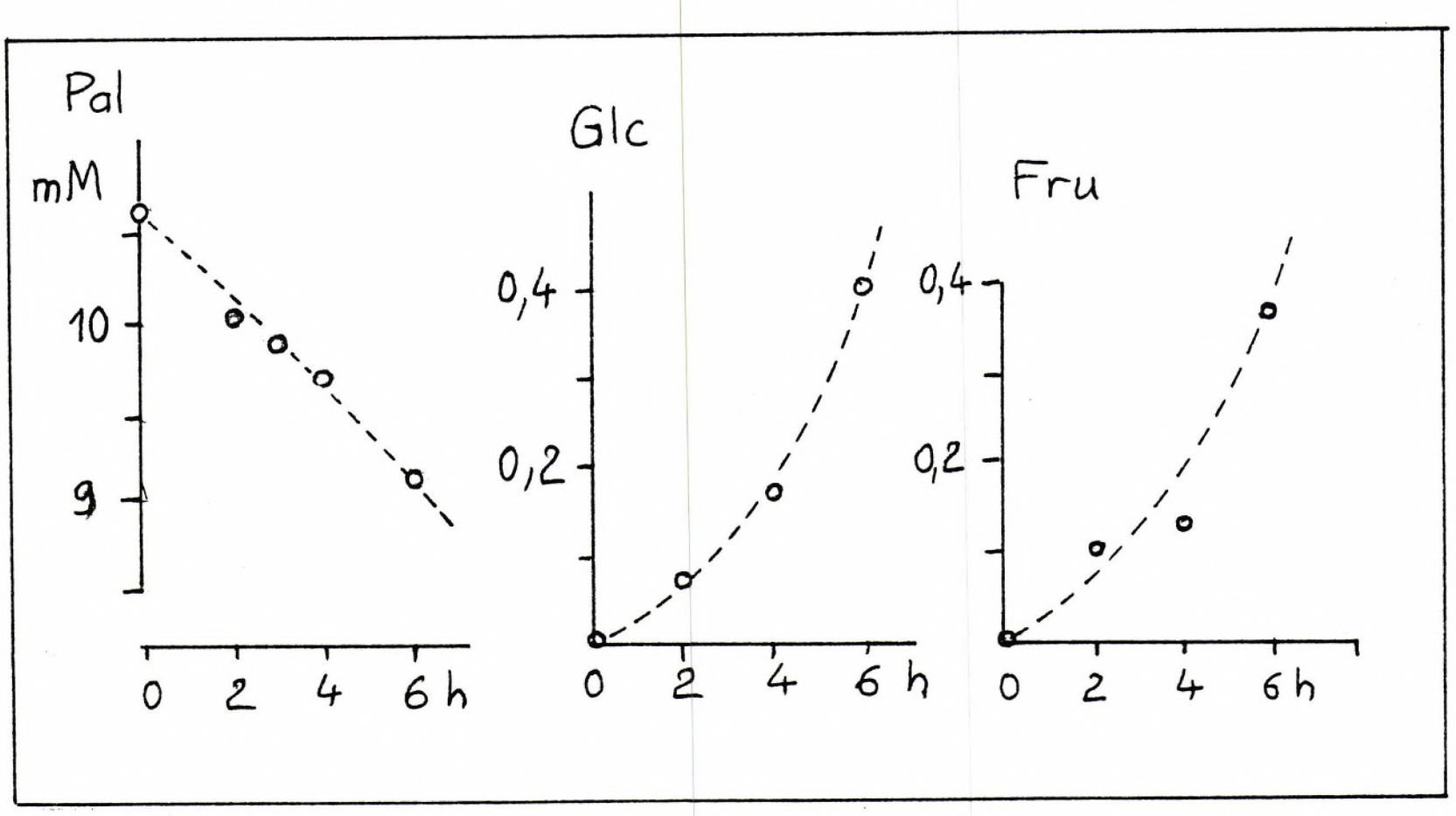


Fig. 26 - Hydrolyse acide du Palatinose

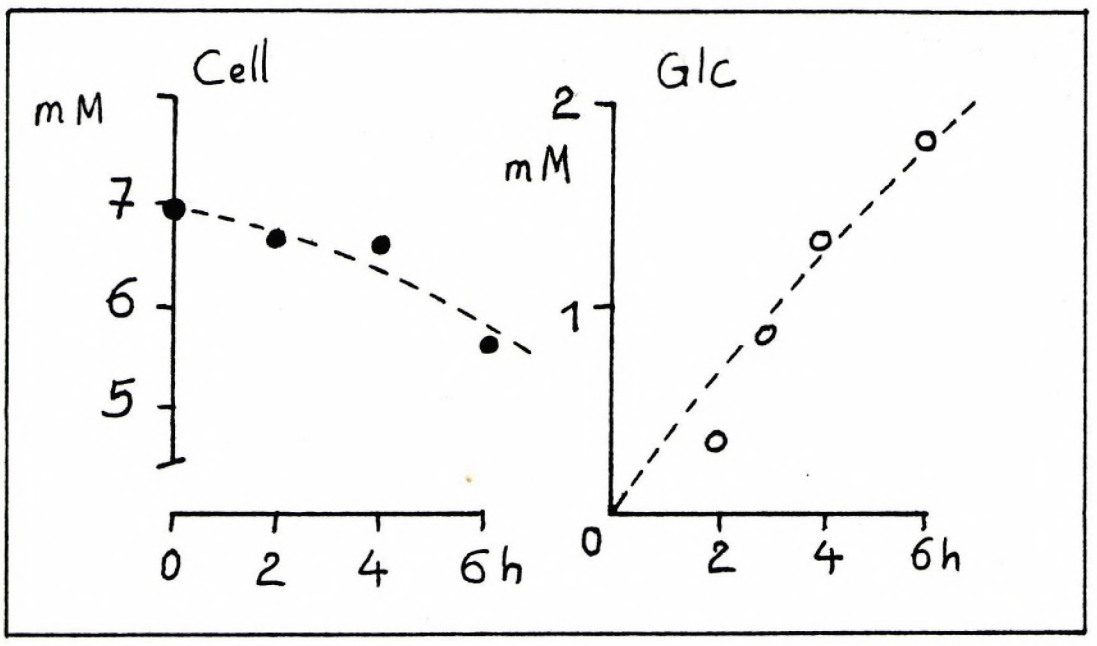


Fig. 27 - Hydrolyse acide du Cellobiose

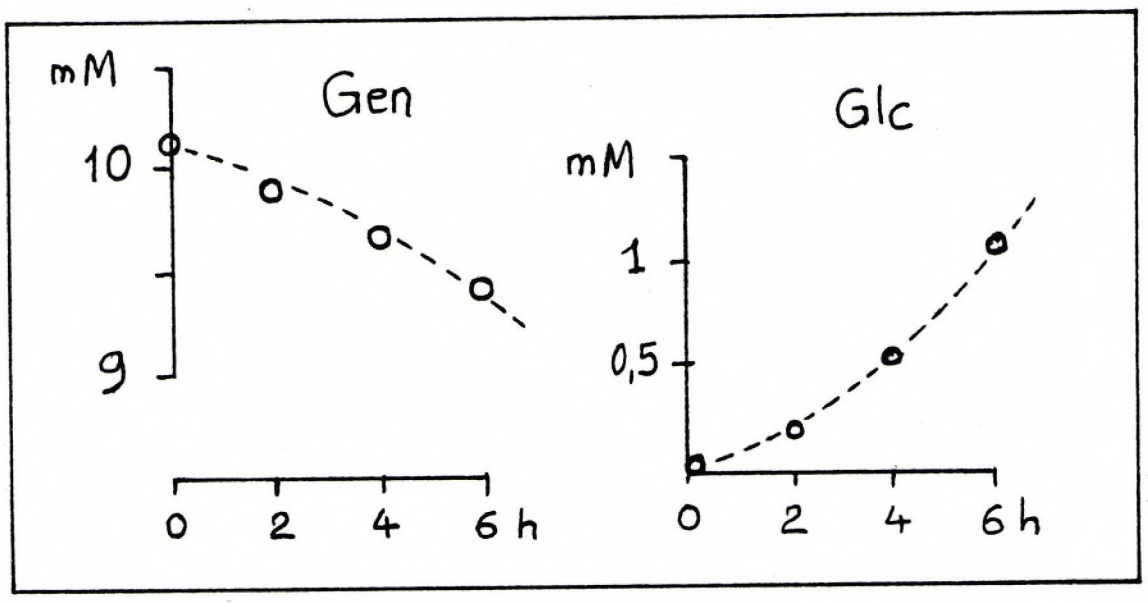


Fig. 28 - Hydrolyse acide du Gentiobiose

La fig. 26 illustre le processus d'hydrolyse du cellobiose. Les cinétiques sont décrites, en régression linéaire, par les paramètres suivants :

cell. : ρ = -0,893 ; b = -0,203 mM/h

Glc : ρ = 0,982 ; b = 0,33 mM/h

L'hydrolyse du gentiobiose est décrite par les paramètres suivants et illustrée par la figure 27 :

Gen : ρ = -0,999 ; b = -0,124 mM/h

Glc : ρ = 0,960 ; b = 0,171 mM/h

L'hydrolyse du turanose est illustrée par la fig. 28 et décrite par les paramètres de régression/corrélation linéaire ci-dessous :

Tur : ρ = - 0,971 ; b = 0,19 mM/h

Glc : ρ = 0,995 ; b = 0,10 mM/h

Fru : ρ = 0,991 ; b = 0,11 mM/h

Enfin, l'hydrolyse du saccharose est illustrée par la fig. 29 : les vitesses de réactions calculées entre To et To + 2 h sont sensiblement égales à : 0,426 mM/h (Sacc)

0,30 mM/h (Glc)

0,35 mM/h (Fru)

Il apparaît donc, au bilan, que la liaison osidique du composé inconnu est plus labile, dans les conditions expérimentales observées, que celles des diholosides étalons.

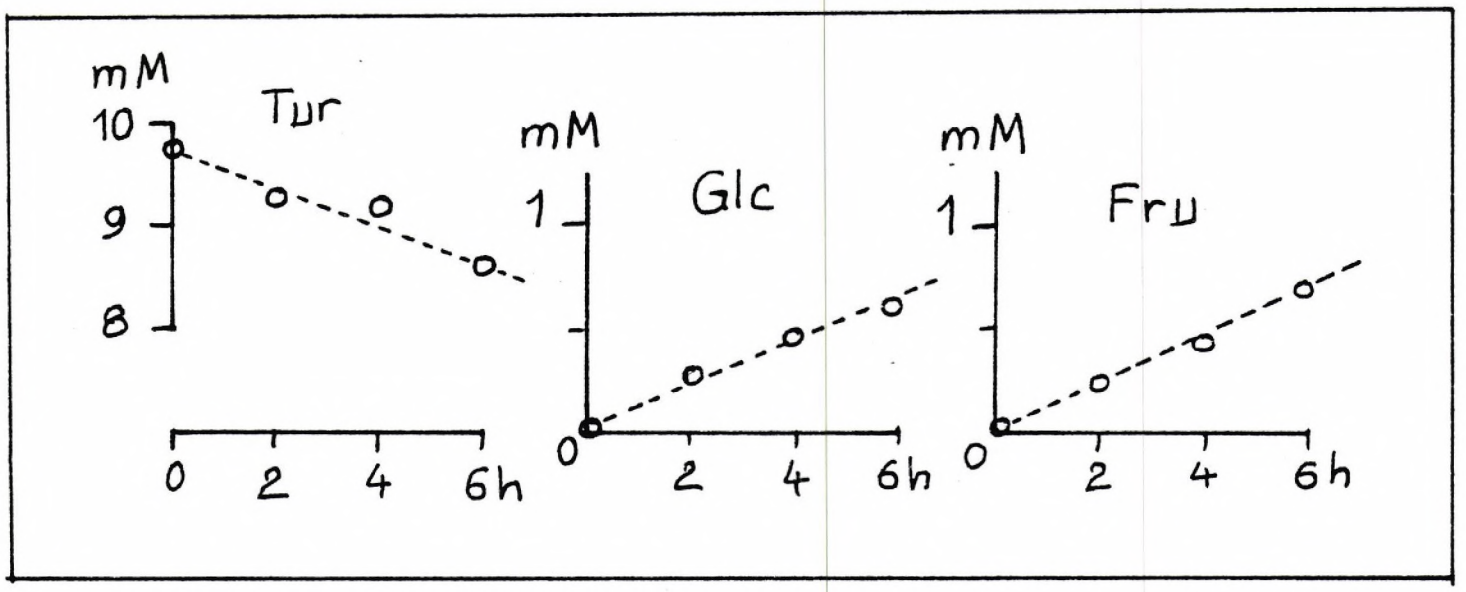


Fig. 29 - Hydrolyse acide du Turanose

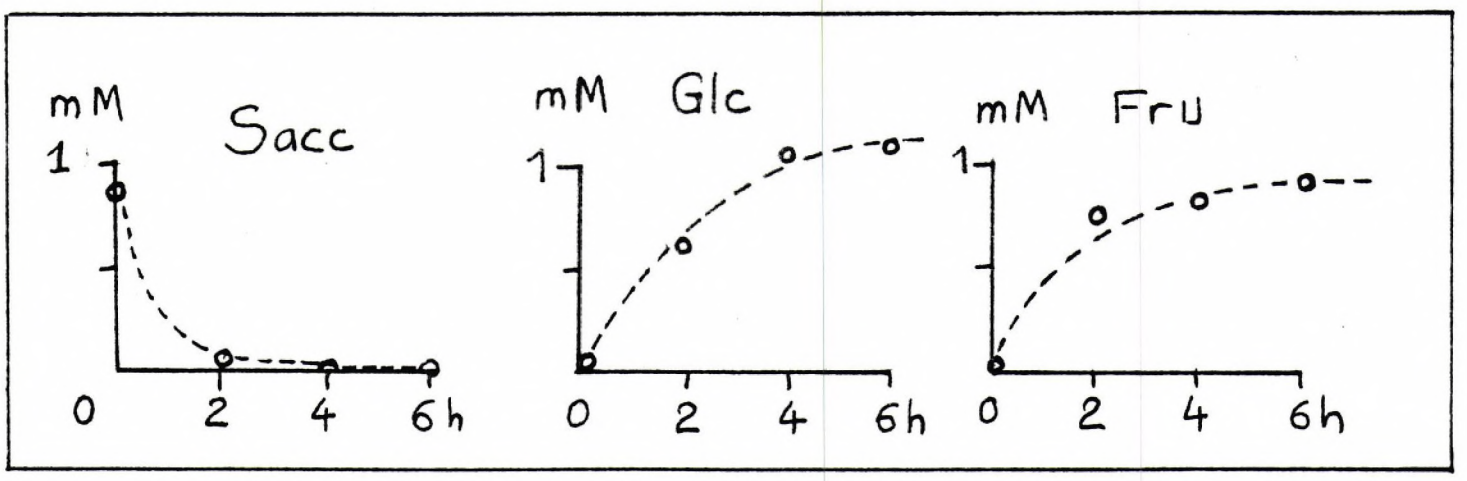


Fig. 30 - Hydrolyse acide du Saccharose

3 - Traumatologie biochimique végétale

La nature ne ment jamais
(Schopenhauer, Métaphysique de la mort
U.G.E., 1968, p. 108)

Les principes d'études mis en application dans le cadre du contrat précédent avec le CNES ont été résumés au cours d'une communication présentée sur invitation, au colloque international tenu dans les nouveaux locaux du siège du CNES, à Paris, le 24 juin. Parmi les participants à ce colloque, figuraient notamment :

- le professeur Allen J. HYNEK, Sc. Director C.U.F.O.S. (USA)
- le Dr. R.C. NIEMTZOW, Traumatologiste à l'U.S. Air Force (USA)
- le Dr. J. VALLEE (USA)
- M. VELASCO, Responsable du GEPAN et divers membres et collaborateurs du CNES

Principes de traumatologie biochimique destinés à l'étude des phénomènes aérospatiaux d'origine inconnue : bilan de l'enquête de Trans-en-Provence et Projets de Recherches.

Dr. M. BOUNIAS, D.R.

Laboratoire de Biochimie, INRA-AVIGNON, BP 91, 84140 Montfavet (France)

Il est possible, sous plusieurs conditions, de déterminer si le passage d'un phénomène aérospatial non identifié a laissé des traces au niveau de la biochimie des Etres Vivants : ce sont ces conditions qui seront examinées en premier lieu.

L'action d'un effecteur ne peut-être mise en évidence que par comparaison avec l'état de sujets non traités. Or, par définition, il n'est pas possible de prévoir où et quand se déroulera un phénomène inconnu : cela suppose donc d'abord une capacité de l'analyste à s'adapter à des conditions de terrain imprévues et à des organismes vivants déterminés seulement par le site. Le laboratoire de biochimie s'est précisément doté de microtechniques quantitatives applicables à un grand nombre de métabolites animaux et végétaux (1).

Les espèces vivantes retenues pour être analysées devront être strictement sédentaires afin qu'il soit possible d'établir avec certitude la position des échantillons par rapport aux traces éventuelles ou aux repères de position du phénomène décrits par les témoins.

(1) M. BOUNIAS - L'analyse Biochimique Quantitative par nanochromatographie en couche mince - MASSON Ed., 1983, 205 pp.

Des échantillons de la même espèce provenant de conditions écologiques aussi voisines que possible seront prélevées à une distance éloignée (non exposée au phénomène) afin de servir de Témoins.

Cependant, au cas ou le phénomène se manifesterait sur les Etres Vivants par l'intermédiaire d'un champ énergétique, de telles comparaisons pourraient s'avérer inefficaces en raison de l'existence possible de relations doses/effets de type biphasique (2).

Il est donc indispensable de recueillir des séries d'échantillons situés à des distances croissantes depuis l'épicentre du phénomène jusqu'à la station la plus éloignée, sur le même type de sol.

Dans l'hypothèse où le champ énergétique serait de type anisotrope, il est préférable de choisir les échantillons le long d'un même axe passant par l'épicentre du phénomène.

L'action d'un effecteur administré au temps To peut être suivie en laboratoire à intervalles successifs, sous la forme d'une étude cinétique.

Dans le cas présent, à supposer que les enquêteurs puissent être présents, immédiatement sur les lieux, il ne disposeront pas nécessairement d'une quantité suffisante de matériel biologique pour pouvoir effectuer, en un même point, des prélèvements échelonnés dans le temps : c'est donc la relation distance/effets qui remplacera la cinétique et représentera une hypothétique relation doses/effets.

Enfin, comme cela a pu être appliqué à Trans-en-Provence, les mêmes prélèvements d'échantillonnages pourront être répétés sur le même site, dans les mêmes conditions après un délai assez long pour permettre de formuler l'hypothèse que l'influence du phénomène a disparu : ces contrôles seront effectués à intervalles annuels, à la même saison, de façon que les espèces analysées se trouvent chaque fois au même stade de leur développement et dans les mêmes conditions géoclimatiques.

Dans l'enquête de Trans, le délai entre les deux séries a été de 2 ans. Les échantillons ainsi prélevés 2 ans après la manifestation du phénomène ont été supposés refléter essentiellement la variabilité biochimique naturelle, en l'absence d'éléments rémanents ou dans l'hypothèse de leur affaiblissement avec le temps.

Après comparaison des moyennes et des variances, dans les deux cas (To et To + 2 ans), les corrélations effets/distances ont été comparées pour chaque classe biochimique étudiée. Des différences peuvent alors apparaître dans des cas où les comparaisons des moyennes et des variances ne sont d'aucune signification. Mais l'existence de relations polyphasiques peut également invalider les calculs de régression eux-mêmes. Il reste alors un dernier et précieux recours : l'étude des relations fonctionnelles entre paramètres biochimiques pris deux à deux.

(2) M. BOUNIAS et H. PACHECO, 1972, C.R. Acad. Sc., 275D, 201-204.

Les échantillons analysés à To + 2 ans, malgré l'inévitable hétérogénéité écologique, ont effectivement fourni des relations entre pigments photosynthétiques, amino-acides et glucides de même nature que celles qui avaient été précédemment découvertes chez d'autres végétaux cultivés dans des conditions contrôlées au laboratoire (3)(4). Or, l'étude des échantillons prélevés 40 j. après l'apparition du phénomène a montré que les relations fonctionnelles étaient alors modifiées au point d'être inversées, ce qui traduit la manifestation de perturbations physiologiques très profondes et relativement durables.

L'identification de la cause des traumatismes observés ne peut être effectuée, en l'état actuel, que par comparaison avec les effets d'autres causes définies. Il serait souhaitable de poursuivre l'édification du "catalogue sémiologique" déjà entrepris au cours des années 66-70 (3) grâce auquel, les traumatismes observés ont pu être assimilés à ceux que produiraient, de manière superposée, une altération des oxydations phosphorylantes associée à d'autres facteurs non encore déterminés. En outre, les relations observées en fonction de la distance à l'épicentre du phénomène suggèrent l'hypothèse d'une source radiative. Parmi les agents physiques pouvant être invoqués, l'hypothèse de champs électro-magnétiques serait à retenir, en raison de l'impact des composantes électrique et magnétique, constantes ou pulsées sur les fonctions biochimiques fondamentales (5).

Il paraît, en conclusion; indiqué de poursuivre des recherches dans cette direction, en relation possible, pour commencer, avec les sources d'énergie associables à des modes de propulsion tels que la M.H.D.. D'ores et déjà, le laboratoire de biochimie serait en mesure d'obtenir le concours de physiciens pour la fourniture de générateurs de champ e.m., et dispose de candidatures pour des périodes post doctorales de chercheurs étrangers chevronnés déjà compétents dans ce domaine de recherches : il reste à résoudre le seul problème restant en suspens : celui de l'attribution de bourses. En revanche, un tel programme ne pourrait qu'aboutir, à terme, à des résultats utiles, non seulement dans le cadre de la simulation des effets d'objets non identifiés, mais également, en particulier dans les domaines de la biologie spatiale, de la médecine et de l'agriculture.

(Exposé illustré par 14 diapositives)

(3) M. BOUNIAS, 1972 - Thèse d'Etat Doctorat ès Sciences, LYON I, n°98, 262 p.
(4) M. BOUNIAS, 1975 - Can. J. Bot., 53, 708-719
(5) M. BOUNIAS, 1984 - Coll. Internat. Biol. Théor., Fresnes

4 - Développements techniques (M. Bounias et Mme M.H. Daurade)

Certaines anomalies quantitatives ont été constatées lors de dosages effectués avec le spectrophotodensitomètre Shimadzu CS930 : la cause de ces anomalies a été rapidement mise en relation avec le temps extrêmement important pris par l'appareil pour enregistrer une plaque (plusieurs heures, selon les conditions de programmation de l'appareil). Les composés enregistrés en dernier lieu se trouvaient ainsi sous-estimés par rapport aux autres, ce qui nous a conduit à déterminer les cinétiques de variations de l'absorbance des taches de glucides révélées sur plaques chromatographiques de gel de silice au moyen du NEDIAC.

Une première série de mesures (85-124) effectuées de 0 à 4 heures après révélation a fait apparaître de notables diminutions d'intensités de colorations pour tous les glucides étudiés : mais les mesures restaient entachées d'une variabilité encore importante. Une seconde série de mesures (85-157) illustrée par la fig. 30 et 31, a permis de calculer de manière plus précise les coefficients de correction à apporter en fonction du temps écoulé après le début des enregistrements, le phénomène étant linéaire pendant au moins 6 heures. Le tableau 33 donne les valeurs numériques des coefficients mesurés au cours des deux séries expérimentales.

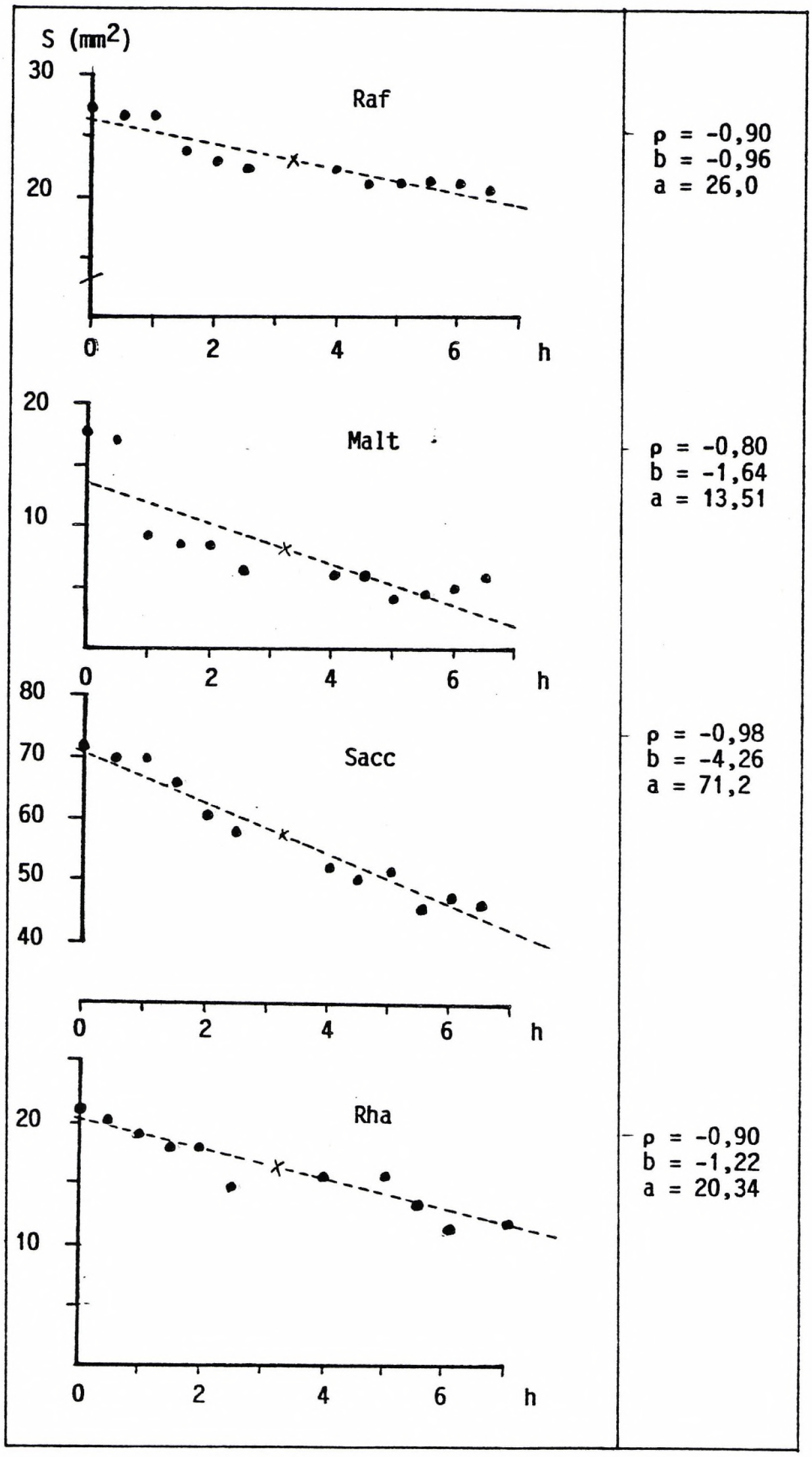


Fig. 31 - Altération en fonction du temps des surfaces de pics (mm^2) de quelques glucides révélés au NEDIAC : Raf ; Malt ; Sacc ; Rha

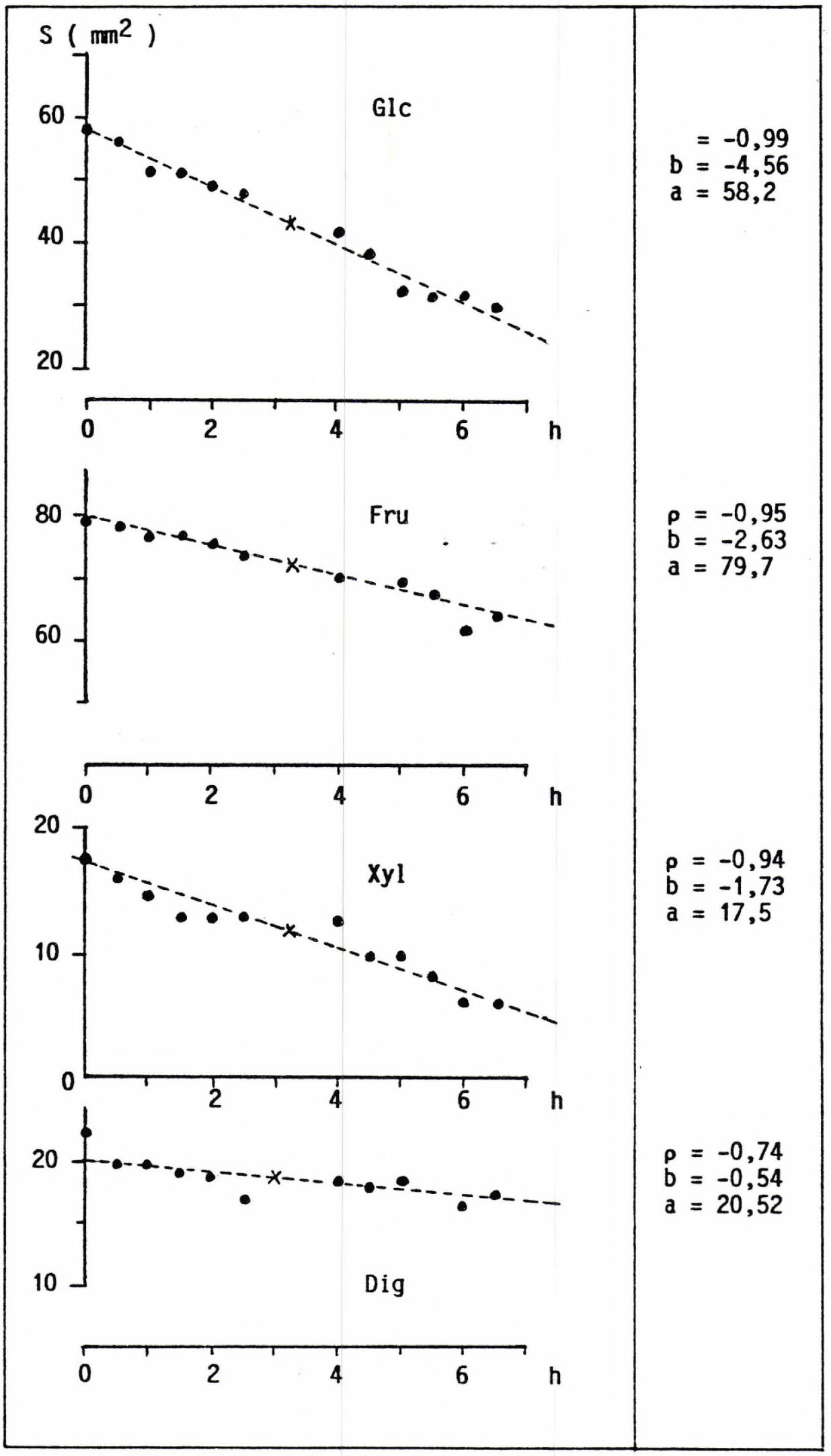


Fig. 32 - Altération en fonction du temps des surfaces de pics (mm^2) de quelques glucides révélés au NEDIAC : Glc ; Fru ; Xyl ; Dig

Tableau 33 - Coefficients de correction à apporter aux dosages de glucides en fonction du temps écoulé depuis le début des enregistrements. Les données figurant entre parenthèses proviennent des évaluations provisoires de la 1ère série.

Temps (h)	Raf	Malt	Sacc	Glc	Fru	Xyl	Rha	Dig
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,5	1,02 (1,00)	1,06 (1,03)	1,03 (1,01)	1,04 (1,01)	1,02 (1,02)	1,05 (1,02)	1,03 (1,03)	1,02 (1,02)
1	1,04 (1,00)	1,12 (1,05)	1,06 (1,02)	1,08 (1,02)	1,03 (1,04)	1,10 (1,05)	1,06 (1,07)	1,04 (1,04)
1,5	1,06 (1,00)	1,18 (1,05)	1,09 (1,02)	1,12 (1,02)	1,05 (1,04)	1,15 (1,05)	1,09 (1,10)	1,05 (1,07)
2	1,07 (1,00)	1,24 (1,10)	1,12 (1,04)	1,16 (1,04)	1,07 (1,08)	1,20 (1,11)	1,12 (1,13)	1,07 (1,09)
2,5	1,09 (1,05)	1,30 (1,13)	1,15 (1,05)	1,20 (1,05)	1,08 (1,09)	1,25 (1,14)	1,15 (1,17)	1,09 (1,11)
3	1,11 (1,09)	1,36 (1,15)	1,12 (1,06)	1,24 (1,06)	1,10 (1,11)	1,30 (1,31)	1,18 (1,20)	1,11 (1,13)
3,5	1,13 (1,12)	1,42 (1,20)	1,21 (1,07)	1,27 (1,07)	1,12 (1,13)	1,35 (1,44)	1,21 (1,23)	1,12 (1,15)
4	1,15 (1,15)	1,49 (1,28)	1,24 (1,17)	1,31 (1,22)	1,13 (1,25)	1,39 (1,58)	1,24 (1,27)	1,14 (1,17)
4,5	1,15 (1,19)	1,55 (1,37)	1,27 (1,29)	1,35 (1,37)	1,15 (1,37)	1,44 (1,71)	1,27 (1,30)	1,16 (1,20)

Les paramètres d'étalonnage pourraient être également affectés par l'altération des surfaces de pics : le tableau 34 indique les variations du coefficient d'expansion linéaire x (cf. Bounias, 1980, Analytical Biochemistry, **106**, 291-295) en fonction du temps écoulé depuis le début des enregistrements. Ceux-ci ont été opérés en mode rapide, sans "balayage" transversal.

Tableau 34 - Variations des valeurs de x en fonction du temps

Glucides :	Sacc	Glc	Fru
2 h 15	2,17	1,65	1,27
3 h	1,82	2,07	1,44
4 h 30	2,31	2,01	1,30
5 h	2,07	2,10	1,51
5 h 30	1,82	2,20	1,36
6 h	2,20	2,10	1,39
6 h 30	2,17	2,31	1,30
7 h	1,90	2,27	1,69
Moyenne (σ)			
Corrélation $\rho_{(t)}$	-0,006	0,866	0,461
Pente de régr. b	-0,007	0,10	0,04

Il n'apparait de corrélation significative qu'avec le glucose, mais la pente de régression, faible, montre que le phénomène est d'une importance quantitativement limitée.

5 - Projets de Recherches

5 - 1 - Identification de l'hétéroside [10+15]

Au cours de 1986, le travail se poursuivra avec d'une part, la détermination de la position épimérique de la liaison glucose, et d'autre part, un essai d'isolement de l'aglycone en vue d'analyser sa structure.

5 - 2 - Action des attaques et infections

L'identification des glucides dans les échantillons décrits sur la fig. 20 et dans les tableaux 27 et 28 se poursuivra en relation avec Mme Frérot, Mlle Milat et Mme Charpin à Brouessy. L'analyse quantitative

comparée des glucides libres et conjugués sera conduite en parallèle avec un essai de caractérisation des substances phénoliques. L'étude de l'ensemble des échantillons peut représenter plusieurs années de travail, compte tenu du nombre de prélèvements, d'une part, et des mises au point techniques à réaliser, d'autre part. Toutefois, les résultats escomptés, en fonction de la nature de l'attaque (insecte ou champignon) et de la durée nécessaire à l'apparition de symptômes visibles, (7-14-28 j.) sont d'un intérêt suffisamment général, dans le cadre des relations hôtes/parasites, pour justifier la mise en oeuvre de l'opération. Seul, le financement sera, de toute manière, inférieur au coût réel.

5 - 3 - ATP "Messagers Chimique" 1985

sous programme Biochimie :

Mécanismes moléculaires liés aux réactions du pin sylvestre à des agresseurs parasites et pathogènes

Responsable : DR. M. BOUNIAS, Directeur de Recherche, pour la partie biochimique

De nombreux végétaux réagissent à des traumatismes mécaniques, ou à l'attaque de parasites et de pathogènes, par une intensification de la lignification (1), en particulier sous forme d'appositions autour du point d'attaque. Divers alcools aromatiques du type polyphénols figurent parmi les précurseurs biosynthétiques des lignines (alcool conifé́rylique, sinapylique, etc ...) ainsi que les acides correspondants (sinapique, férulique, caféique, etc ...). Ces composés peuvent subir diverses transformations telles que des glycosylations (2) ou des cyclisations leur conférant une structure anthocyanique, (par exemple, la catéchine, dérivée de l'acide caféique). A l'origine des processus de polymérisation, des déshydrogénases à FAD créent des radicaux libres sur les monomères : il en résulte une activité induite des péroxydases qui a pu être effectivement mise en évidence au cours de certains phénomènes de résistance (3).

Les variations des concentrations des monomères (acides, aldéhydes, phénols) sous forme libre, conjuguée ou modifiée, peuvent donc apporter d'importants renseignements sur la nature des mécanismes de résistance mis en oeuvre par la plante (4)(5).

Dans une phase expérimentale préliminaire, nous envisageons de séparer et doser un certain nombre de ces composés par chromatographie liquide à haute pression (CLHP) et tenter d'en établir les spectres comparatifs chez les arbres sains, attaqués, infectés par des pathogènes différents, ou ayant subi d'autres formes de traumatismes : la spécificité éventuelle des réponses constitue, en effet, l'un des objectifs de cette démarche.

La phase de mise au point analytique est en cours. Des chromatogrammes étalons ont d'ores et déjà été établis à partir de mélanges contenant les acides féruliques, cinnamique et caféique, ainsi que la rutine.

Durées envisagées : recherches méthodologiques : 6 mois
analyses des échantillons : 18 mois

Perspectives à long terme.

a) Dans l'hypothèse où l'étude préliminaire ferait apparaître des divergences entre la composition des arbres attaqués et celle des arbres sains, les fractions moléculaires concernées seraient isolées et purifiées, et leur étude de structure entreprise.

L'étude des mécanismes enzymatiques impliqués pourraient alors être abordée avec profit.

b) L'intérêt d'une étude expérimentale des mécanismes moléculaires liés à la lignification est d'autant plus grand que ces mêmes processus peuvent être également impliqués dans la détoxification de molécules xénobiotiques, lesquelles peuvent être neutralisées par copolymérisation avec les oligomères naturels dans les lignines (6). Il s'agit là d'un aspect nouveau du problème, présentant un très grand intérêt.

(1) BELL A.A., 1981. Biochemical Mechanisms of Disease resistance. Ann. Rev. Plant Physiol., **32**, 21-81

(2) BOHLMANN F., ZDERO C., KING R.M. and ROBINSON H., 1983. Unusual phenylpropanoid glycosides from Paranephelins uniflorus. Phytochemistry, **22**(6), 1485-1488.

(3) COULOMB C., MOLOT P.M., MAS P., COULOMB Ph. J. et BOUNIAS M., 1983. Analyse des variations de l'activité péroxydasique soluble (E.C. 1-11-1-7) dans les feuilles de Capsicum annuum (piment) au cours d'une induction systémique de résistance au Phytophthora capsici (Mildiou). C. R. Acad. Sc. (Paris) série III, **296**, 225-230

(4) KLEEN N.T., LITTLEFIELD L.J., 1979. The possible association of phytoalexins with resistance gene expression in flax to Melampsora Lini. Physiol. Plant Pathol., **14**, 265-280

(5) SHAIN L. et HILLIS W.E., 1971. Phenolic extractives in Norway spruce and their effects on Fomes annosus. Phytopathology, **61**, 841-845.

(6) SANDERMANN H. Jr., SCHEEL D. et VAN DER TRENCK T., 1983. Metabolism of environmental chemicals by plants. Copolymerization into lignin. J. Appl. Polym. Sci., **37**, 407-420

IV - LISTE DES PUBLICATIONS

1 - Titres parus

n° 87 - BOUNIAS M. & MORGAN M.R.J. - 1985 - Short-term adaptation of honeybee haemolymph disaccharidase following trehalose injection. **Comp. Biochem. Physiol., 80B**(3), 451-454

n° 88 - BOUNIAS M., DUJIN N. & POPESKOVIĆ D. - 1984- Effects of sublethal doses of a synthetic pyrethroid : deltamethrin, on the glycemia, the lipemia, and the gut alkaline phosphatases of the honeybee. **Pestic. Biochem. Physiol., 14**(2), 149-160

n° 93 - BOUNIAS M. - 1985 - Corrélations fonctionnelles glucido-lipidiques dans l'hémolymphe d'abeilles soumises au jeûne. **C.R. Acad. Sci.,** série III, **300**(9), 381-384

n° 95 - BOUNIAS M. - 1984 - Effets anti-adrénergiques du propranolol sur la glycémie de l'abeille (apis mellifera, mellifera, L.) in vivo. **C.R. Réunion commune des Sociétés de Biologie et de Chimie Biologique : Pharmacologie** : "aspects moléculaires et fonctionnels" (Université de Montpellier), 9 Nov. 1984, 2 pp. **C.R. Soc. Biol., 179**, 218-223

n° 99 - BOUNIAS M. - 1985 - Evolution comparée de la glycémie et le la lipémie chez l'abeille au cours du jeûne. **C.R. Soc. Biol., 179**(3), 352-364

n°100 - BOUNIAS M., MOREAU R. & GOURDOUX L. - 1985 - Une inter-relation entre glucose et acides gras, induite dans l'hémolymphe d'abeilles par l'injection d'insuline spécifique et supprimée par la somatostatine de vertébrés. **C.R. Acad. Sci.,** sér. III, **300**(17), 623-626

n°101 - LORIENT R. & BOUNIAS M. - 1985 - Variations de la teneur en glucides solubles dans les feuilles de piment Capsicum annuum infestées par Phytophthora capsici et traitées au préalable par le Phoséthyl d'aluminium. **Proc. Int. Congr. 1985. Fungicides for Crop Protection. BCPC Monograph n°31,** C-8, 293-296

2 - Manuscrits acceptés et mis sous presse

n°94 - MOREAU R. & BOUNIAS M. - 1985 - Effects of honeybee insulin-immunoreactive peptide on the honeybee haemolymph lipid and carbohydrate : interaction of vertebrate somatostatin. **Insect Biochem.**

n°98 - BOUNIAS M. - 1985 - Effects biochimiques comparés de l'injection des formes cyclique et linéaire de la somatostatine de Vertébrés chez l'abeille in vivo : II - La lipémie. **C.R. Soc. Biol., 179**(5), 591-599

n°102 - DEBEVEC M., POPESKOVIĆ D. & BOUNIAS M. - 1985 - A comparison of haemolymph lipid classes at different stages of the honeybee development. **Acta Veterinaria (Beograd), (**5-6)

n°104 - BOUNIAS M. - 1985 - Analogie de deux effecteurs hyperglycémiants : l'AMP cyclique et le glucagon, injectés chez l'Abeille in vivo. **C.R. Acad. Sci. 302**(5), 141-144

---

3 - Demandes de tirés à part :

n°80 - BOUNIAS M., COULOMB C. & COULOMB Ph. J. - 1984 - Relat. bet. free carboh. lev. resist. suscep. of Caps. annuum to Phythoph. capsici. **Can. J. Bot. 62,** 1036-43 (35 dem. 84 et 10 dem. 85)

n°82 - BOUNIAS M., DEMONGEOT J. & MORGAN M.R.J. - 1984 - Damped oscill. ind. treh. and hemol. treh. result. from diet. inputs of sucr. or treh. **IRCS Med. sci., 12,** 546-547 (9 dem. 84 et 2 dem. 85)

n°83 - BOUNIAS M. & MORGAN M.R.J. - 1984 - Induct. honeyb. haemol. sucr. act. by high lev. of diet. sucr. **Comp. Biochem. Physiol. 79B**(1), 75-80 (3 dem. 84 et 27 dem. 85)

n°84 - BOUNIAS M. & MORGAN M.R.J. - 1984 - Adapt. honeyb. haemol. α-gluc. to chang. physiol. requir. by trans. in the Hill coeff. **Int. J. Biochem. 16**(8), 939-941 (9 dem. 84 et 7 dem. 85)

n°85 - BOUNIAS M. & MORGAN M.R.J. - 1984 - Formes mol. comp. tréh., sacch. et pNP α-D-glucos. de l'hémol. ab. après induc. des sacch. par le saccharose per os. **C.R. Soc. Biol. 178**, 29-37 (11 dem. 84 et 4 dem. 85)

n°86 - BOUNIAS M. & MORGAN M.R.J. - 1984 - Haemol. lev. of carboh. and sucr. act. in honeyb. fed on treh. **IRCS Med. Sci. 12**, 769-770 (14 dem. 84 et 13 dem. 85)

n°90 - BOUNIAS M. - 1984 - Rech. Bioch. et rel. Homme/Abeille. C.R. coll. sem. Rég. Apic., Avignon, 6/4/84. **Rev. Franç. Apic.,** (438), 84-89 (1 dem. 85)

n°91 - BOUNIAS M. - 1984 - L'aff. de l'OVNI de Trans-en-Prov. et le rôle de l'INRA ou l'appl. d'un program. de rech. sur la caract. des traum. vég. à l'ét. des dismétab. cons. à un phénom. d'orig. incon. **J. C.N.R.A.**, (8), 1-6-7 (1 dem. 85)

n°92 - BOUNIAS M., MOREAU R. & GOURDOUX L. - 1984 - Act. de l'insul. endog. sur la glyc. de l'ab. et interact. de la somatost. de vert. **C.R. Soc. Biol. 178**, 705-711 (22 dem. 85)

n°96 - BOUNIAS M. - 1984 - Effets biochim. comp. de l'inj. des formes cycl. et lin. de la somato. de vert. chez l'ab. in vivo. I - La glycémie. **C.R. Soc. Biol. 178,** 627-632 (21 dem. 85)

n°87 - BOUNIAS M. & MORGAN M.R.J. - 1985 - Short-term adap. of honeyb. haemol. disacch. foll. treh. inj. **Comp. Biochem. Physiol. 80B**, 451-454 (25 dem. 85)

n°88 - BOUNIAS M., DUJIN N. & POPESKOVIC D. - 1985 - Effects of subl. doses of a synth. pyrethroid : deltamethrin, on the glyc., the lip. and the gut alk. phosphat. of the honeyb. **Pestic. Biochem. Physiol. 24**(2), 149-160 (18 dem. 85)

n°93 - BOUNIAS M. - 1985 - Corrél. fonct. glucido-lipid. dans l'hémol. d'ab. soumises au jeûne. **C.R. Acad. Sci. 300**, 381-384 (33 dem. 85)

n°99 - BOUNIAS M. - 1985 - Evol. comp. de la glyc. et de la lipé. chez l'ab. au cours du jeûne. **C.R. Soc. Biol. 179**(3), 352-364 (1 dem. 85)

n°100 - BOUNIAS M., MOREAU R. & GOURDOUX L. - 1985 - Une inter-rel. entre gluc. et ac. gras, ind. dans l'hemol. d'ab. par l'inj. d'insul. spéc. et supprimée par la somato. de vert. **C.R. Acad. Sci. 300**(17), 623--626 (28 dem. 85)

DIVERS : - 64 demandes en 1984
- 112 demandes en 1985

TOTAL : 143 demandes en 1984
213 demandes en 1985

356

VI - ACTIVITES ANNEXES

1 - Recherche bibliographique.

Le retard accumulé dans le dépouillement des Chemical Abstracts du fait d'un interruption antérieure des livraisons n'a pu être comblé. A la fin de 1985, l'analyse systématique des volumes n'a pu être achevée que jusqu'au vol. 101, n°8 (oct. 1984). Des recherches ponctuelles ont cependant été opérées dans les volumes de 1985 (ex : aminergiques).

Au cours de l'année, 1.365 demandes de tirés à part (auteurs et CNRA) ont été formulées. Les fiches ont maintenant largement dépassé la dizaine de milliers et de nouveaux sous-fichiers devront être constitués en 1986. En outre, le classement alphabétique des documents originaux (tirés à part) exige désormais la mise à disposition d'un volume de rangement (d'accès facile) important, à trouver en supplément aux locaux actuels.

2 - Relations Internationales et demandes sabbatiques

2-1 - Collaboration avec l'Université d'ULM.

Le Prof. Dr. Volker MAIER a rendu visite au LBC du 27 au 29 Mars, envoyé par l'Université d'ULM (Institut du Prof. Dr. PFEIFFER) en vue d'établir une collaboration dans le domaine de la régulation du métabolisme de l'abeille par des hormones analogues à celles des Vertébrés. A noter qu'une correspondance adressée par le "Zentrale Einrichtung Klinishe Chemie" au Ministère français des Relations Internationales entre janvier et février 1985 est restée sans réponse.

De nouvelles démarches ont été engagées par l'Université d'ULM fin 85 : copie des documents reçus au LBC sera transmise systématiquement au SRI-INRA.

2-2 - Demandes sabbatiques.

Deux chercheurs étrangers de haut niveau ont sollicité la possibilité d'effectuer des stages de Recherche au LBC :

- Le Dr. J. SHANKER, M. Sc. Ph.D., DBA, lecturer in Agr. Biochemistry, Dept. of Agricultural Chemistry, University of Allahabad, College of Agriculture. India
(C.V. joint en annexe)

- Le Dr. D.A.A. AKINTONWA, B. Sc., Ph.D., F.I.M.L.S., C. Chem., F.R.S.C. (membre de l'Acad. des Sc. de Calabar) reader in Biochemistry, Dept. of Biochemistry, University of Calabar, Nigeria.
(C.V. joint en annexe)

- Orientations possibles : le Dr. SHANKER étant spécialisé en biochimie des denrées alimentaires, et auteur d'intéressants travaux sur l'action de champs magnétiques sur l'accroissement du contenu vitaminique de plantes cultivées, son dossier a été transmis au CNES qui a formulé une demande de bourse auprès du Ministère de la Recherche. Fin 85, aucun élément de réponse ne nous était parvenu.

Le Dr. AKINTONWA est l'auteur de recherches théoriques et expérimentales sur la toxicologie biochimique, y compris l'induction de résistance de différents organismes aux pesticides : une demande d'attribution de bourse a été adressée au SRI- INRA.

- Attributions - Le SRI a fait savoir qu'une bourse de 5.000 F. par mois pour 4 mois serait disponible en 1986 pour le Dr. M.R.J. MORGAN, déjà venu à 2 reprises pour des séjours sabbatiques au LBC. Or, depuis 2 ans, le Dr. MORGAN se trouve dans l'impossibilité matérielle

de quitter son Université de Lancaster pour des périodes prolongées.

Une demande de transfert de la bourse au Dr. AKINTONWA a donc été adressée au SRI par retour de courrier.

Une demande d'attribution de bourse au Dr. SHANKER sera également formulée début 86.

ANNEXE demandes sabbatiques

BIO-DATA OF Dr. JYOTI SHANKER

Dr. Jyoti Shanker, Date of birth, April 4, 1957

Present Position :

Lecturer in Agricultural Biochemistry, Department of Agricultural Chemistry, K.A.Postgraduate College, Allahabad 211001.

Education :

D.Phil., 1980, Allahabad University

M.Sc. Agril.Biochemistry, 1977, Allahabad University, II Div. 56.5%

B.Sc., 1975, Garhwal University, Srinagar, II Div. 56%.

D.B.A., 1981, Allahabad University, II Div.

Teaching & Research Experience : More than 5 years.

Teaching Agricultural Biochemistry and Agricultural Chemistry to the Postgraduate and Undergraduate students for more than five years.

Studied the effect of various Nitrogenous Compounds, Pesticides, Fertilizers, X-irradiated and Magnetized seeds on the nutritive value of certain vegetables under varied conditions.

Worked on a Council of Science and Technology, Lucknow, sponsored research project aimed at introducing for the FIRST TIME Controlled release, and low residual toxicity properties in some commonly used highly toxic carbamate pesticides. This work has been included in the recommendations of the UNESCO, UNEP & MAB sponsored International Conference on "Environmental Hazards of Agrochemicals" in Alexandria (Egypt), Nov.'83.

Publications :

Published 31 research papers and scientific articles in various national and international journals (Appendix I).

Honours and Professional Affiliations :

1. Invited Speaker and Member Recommendation Committee, International Conference on Environmental Hazards of Agrochemicals, Alexandria (Egypt) Nov.'83.
2. Assistant Secretary, Indian Society of Agricultural Chemists, Ex.Editor, Indian Journal of Agricultural Chemistry.
3. Biography published in the International Youth in achievement Directory, 3rd ed. published by International Biographical Centre, England.
4. Biography published in ENVIROTECH'84, India.
5. Full paper published in the proceedings of the International Conferences of Egypt, Turkey and London.
6. Member, Green Vegetation Society CFTRI, Mysore ; Indian Association of Water Pollution, NEERI, Nagpur, Ind. Soc. of Ag. Chemists, Allahabad.
7. Selected to attend UNESCO sponsored & WHO, WMO assisted International course on Environmental Science and Technology, Hague, Netherlands during 1985-86.

Research Project Undertaken :

Undertaken a U.G.C. sponsored research project on the Effect of Agroindustrial Wastes on the Nutritive Value of Certain Vegetables.

(contd.2)

Participation in Conferences and Courses :

Attended International Conferences on Environmental Hazards of Agrochemicals in Developing countries, Alexandria (Egypt) Nov. 8-12, 1983 (Invited Speaker).

Invited and paper accepted for presentation and proceedings of Inter. Symposium-Environmental Management for developing countries, Turkey, July 25-31, 1981.

Invited and paper accepted for presentation and Proceedings of the Inter. Conf. - Environmental Contamination, London, July 10-13, 1983.

Attended Annual Convention of the Indian Society of Agricultural Chemists at Calcutta (1977), Karnal (1978), Durgapur (1979), Junagadh (1982), Parbhani (1983).

Attended Annual Session, National Academy of Sciences, Allahabad (1980).

Attended Indian Science Congress Association, B.H.U. Varanasi (1981).

Attended Symposium on Seed Physiology & Biochemistry, Lucknow (1981).

Attended I.C.A.R. sponsored Summer Institute on "Food Processing and Nutrition at M.A.U. Parbhani (1982).

Selected among 20 participants to attend Int. Training Course on 'Plant Ecology and Control' at Uni. of Florida, Geinsville, USA, June 10 - July 18, 1984.

Head of Department
Prof. O U. EKA.
Telephone: Calabar 2400, 2120
Telex : 65103 Unical
Telegrams: Unical

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY,
P. M. B. 1115,
Calabar, Nigeria

7 October 19 85

UNIVERSITY OF CALABAR

Michel Bounias, Docteur es Sciences,
Research Director,
Laboratoire de Biochimie
C.R.A. d'Avignon
Domaine de Saint Paul, B.P.91
F84140-Montfavet (France)

Dear Dr. Bounias,

SABBATICAL LEAVE (1986-87 SESSION)

I would like to apply to my University for a year's Sabbatical leave. Before I could do this, I would like to obtain an offer of a Visiting Professorship from an appropriate Institution.

I would therefore be grateful if your Institution could offer me a Visiting Professorship for the 1986-87 Session. I hereby present the following salient particulars in support of my application:

1. Areas of specialisation: Biochemical Toxicology and Mechanisms.

2. Research Experience: Worked for Shell Toxicology Laboratory (Tunstall), Sittingbourne Research Centre (SRC), Shell Research Ltd., UK (1963-78). Relinquished appointment as Senior Scientist to take up my present appointment as Reader in Biochemistry in the Department of Biochemistry, College of Medical Sciences, University of Calabar, Nigeria (1978-present). Publications in relevant international journals.

3. Teaching Experience

Division of Food Science, DSIR Assistanship, Borough Polytechnic (Biochemistry), Lipids of Foods (1962-63)

SRC: B.Sc and M.Sc programmes (1973-77).
Biochemical Toxicology.

University of Calabar: Pre-clinical, B.Sc., M.Sc and Ph.D Biochemistry in the areas of fundamental biochemistry, biochemistry of macromolecules, enzymology, structural biochemistry (infra-red, nmr spectroscopy and mass spectrometry

applications in biochemistry), forensic biochemistry, biochemical toxicology, membrane and organelle biochemistry, advanced biochemical techniques and instrumentation and biochemical mechanisms.

4. International Recognition

Served on WHO Task Forces in Geneva (1979-83) on the following monographs as a member of an "International Group of Experts":

Selected Petroleum Products, Environmental Health Criteria (EHC), EHC 20.

Paraquat and Diquat, EHC 39.
Heptachlor, EHC 38,
Chlordecone, EHC 43.

5. On-going Research

(i) Foetal status of endoplasmic reticulum of human livers.

(ii) Enzyme induction studies on biocides (drugs and pesticides).

(iii) Theoretical biochemistry of biocides (drugs and pesticides)

(iv) Biochemistry of traditional medicines.

I thank you for your request of my paper in J.theor. Biol. (1984), 106(1), 79-87. This paper has now brought 105 reprint requests from all over the world. I hereby enclose a copy as you requested.

With my best wishes.

Yours sincerely

DUNSTAN A. A. AKINTONWA, B.Sc., Ph.D., F.I.M.L.S., C.Chem.,F.R.S.C

PUBLICATIONS

Publications in International Journals/Books

Biochemical Toxicology

1. D. E. Hathway, A. Mallinson and D. A.A. Akintonwa (1965) Effects of dieldrin, picrotoxin and telodrin on the metabolism of ammonia in brain.

   Biochem. J.94, 676-686.

2. A.S. Wright, D.A.A. Akintonwa, R.S. Crowne and D. E. Hathway (1965). The metabolism of 2,6-di-tert-butyl-4-hydroxymethylphenol (Ionox 100) in the dog and rat.

   Biochem. J. 97, 303-310.

3. D.H. Hutson, D.A.A. Akintonwa and D.E. Hathway (1967) The metabolism of 2-chloro-1-(2,4-dichlorophenyl) vinyl diethyl phosphate (chlorfenvinphos in dog and rat.

   Biochem. J. 102, 133-142.

4. D.A.A. Akintonwa and D.H. Hutson (1967). Metabolism of 2-chloro-1-(2,4,5 trichlorophenyl) vinyldimethyl phosphate in the dog and rat.

   J. Agr. Food Chem. 15, 632-637.

5. A.S. Wright, D.A.A. Akintonwa and M.F. Wooder (1977). Studies on the interactions of dieldrin with mammalian liver cells at the subcellular level

   Ecotoxicology and Environmental Safety 1, 7-16.

6. D.A.A. Akintonwa and A.S. Wright (1976). Studies on the relationship between degranulation of the rough endoplasmic reticulum and chemical carcinogenesis. TLGR 0045.76 Group Research Report, Tunstall Laboratory. 1-15.

7. D.A.A. Akintonwa et al (1982). In WHO "Environmental Health Criteria (EHC 20) on Selected Petroleum Products", 1-139. As a member of an "International group of experts".

Structural, Theoretical and Mechanistic Biochemistry

8. D.A.A. Akintonwa (1978). The synthesis and stereochemical aspects of optically active phosphorothioates.

   Tetrahedron 34, 959-967.

9. D.A.A. Akintonwa (1982). Some aspects of the human carcinogenicity of aflatoxin B_1 and 3,4 benz (a) pyrene.

   International Journal of Epidemiology 11(3), 293-294 (5 reprint requests)

10. D.A.A. Akintonwa (1982). Mechanisms of chemical carcinogenesis.

    Cameroon Medical Journal. Vol. 11, No.1, 19-24.

11. D.A.A. Akintonwa (1984). Theoretical aspects of enzyme induction and inhibition leading to the reversal of resistance to biocides. Journal of Theoretical Biology 106, 1, 79-87 (105 reprint requests).

Publications in Nigerian Journals/Books

Biochemical Toxicology

12. D.A.A. Akintonwa (1959).
Examination of arrow poisons in Nigeria.
West African Journal of Biological Chemistry Vol. 3, No. 2, 23-26.

13. D.A.A. Akintonwa (1959).
The Chemist and the Public.
West African Journal of Biological Chemistry Vol. 2, No. 4, 91-94.

14. D.A.A. Akintonwa (1979).
Approaches to the discovery of a new biocide.
Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences Vol. 3, No. 5, 271-272.

15. D.A.A. Akintonwa (1983) "Subcellular fractionation of the eukaryotic cell".
In Contemporary Experimental Techniques in Biochemistry. Editors -
E.A. Bababunmi, M.I. Thabrew, G.O. Emerole and A.O. Uwaifo. University
of Ibadan Publishing Company (in press).

16. D.A.A. Akintonwa (1984).
Consequences of carbon tetrachloride and orotate toxicity in mammalian cells
at the subcellular levels. Nigerian Journal of Biochemistry 1,68-75
Structural, Theoretical and Mechanistic Biochemistry

17. D.A.A. Akintonwa (1982).
Nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry of
methyladenine isomers.
Nigerian Journal of Science Vol. 16, 21-31.

18. D.A.A. Akintonwa (1983)
Some aspects of the biochemical mechanisms of the modifying effect of
co-carcinogens. Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences 7,
No. 1, 13.

19. D.A.A. Akintonwa (1983).
Molecular interactions, enzyme induction and biocidal activity in some
parasitic infections. Nigerian Journal of Parasitology (in press).

20. D.A.A. Akintonwa (1983)
Ultrastructure and molecular aspects of a human liver tumour.
Nigerian Journal of Science Vol. 17, 21-28.

21. D.A.A. Akintonwa (1983).
Carcinogenicity of nitrosamines in Nigerian palmwine and our environment.
Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences, 7, 45-47.

PUBLICATIONS 1983/84

Publications in International Journals/Books

Biochemical Toxicology:

22. D.A.A. Akintonwa (1985)
Studies on some biological differences between the chiral forms of methyl-
1-naphthyl-p-nitrophenyl-phosphorothionate. Ecotoxicology and
Environmental Safetys, 53- (2 reprint requests to date)

23. WHO (1984): Environmental Health Criteria, (EHC) 39 for Paraquat and Diquat.
1-187 Members:

D.A.A. Akintonwa, A. Bainovo, J.Bus, R.Davies, G.R. Fitzgerald,
S.K. Kashyapand, L.I. Smith

24. WHO (1984): EHC 38 for Heptachlor, 1-81
Members: Z.Adamis, D.A.A. Akintonwa, R. Goulding, S.K. Kashyap, D.C. Villeneuve and D. Wasserman.

Structural, Theoretical and Mechanistic Biochemistry:

25. D.A.A. Akintonwa (1984)
A new concept in the relationship between biochemical reaction mechanisms and molecular basis of agranulocytosis.
Biochemical Medicine 32, 151-160. (70 reprint requests)

26. D.A.A. Akintonwa (1985)
The derivation of nitrosamines from some therapeutic amines in the human environment. Ecotoxicology and Environmental Safety 9, 64-70
(40 reprint requests to date)

Publications in Nigerian Journals/Books
Structural, Theoretical and Mechanistic Biochemistry:

27. D.A.A. Akintonwa (1983)

Mechanisms of cocarcinogenicity and enzyme induction
Predictability of some solvents in our environment.
Nigerian Journal of Science Vol. 17 1-10

PUBLICATIONS 1984/85

Publications in International Journals/Books

Biochemical Toxicology

28. D.A.A. Akintonwa (1985)
HPLC Separation of Phenobarbitone, thiourea and thioacetamide of toxicological interest
Ecotoxilogy and Environmental Safety (in press)

29. WHO (1984): EHC 43 Chlordecone, 1-57
Members: Z.Adamis, D.A.A.Akintonwa, R. Goulding, S.K. Kashyap. D.C. Villeneuve and D. Wassermann.

30. D.A.A. Akintonwa (1985)
Detachment of ribosomes of rough endoplasmic reticulum by NADPH and reduced glutathione (GSH)
Ecotoxicology and Environmental Safety (in press)

Structural, Theoretical and Mechanistic Biochemistry

31. D.A.A. Akintonwa (1985)
The Correlation between theoretical and experimental transformation of 2-chloro-1-(2' 4' dichlorophenyl) vinyl diethylphosphate (chlorfenvinphos) in the dog and rat.
J. theor. Biol. 114. 103-108 (5 reprint requests to date)

32. D.A.A. Akintonwa (1985)
Mechanism of RNA redistribution of the 17,000g postmitochondrial supernatant after incubation at 37°C and its impact on other related biochemical investigations.

Biochem. Med. (in press)

(Only reprint requests of publications since returning to Nigeria cited).

3 - Dossier informatique

◊ Résumé des épisodes précédents.

Suite à une enquête de la Commission Informatique de Centre (CIC) le LBC avait postulé en 1983 pour un raccordement Mini-6. Aucune possibilité n'avait pu s'ouvrir, la "station de pollution" n'ayant pas donné suite à l'enquête 1980. Un espoir de subvention pour raccordement Multics a été ensuite laissé aux services ayant suivi les démarches nécessaires et assuré la formation de personnels spécialisés. Au LBC, Mme DAURADE a suivi des stages de 5 jours de cours, du 9 au 13 sept. 83, puis de 100 heures de Fortran et Mini 6, en oct. 83, ainsi que le stage Amance 81 en sept. 84.

◊ Situation en 1985.

Le 11.1.85, le LBC donne par lettre au responsable de la CIC son accord pour un raccordement au DPS 8 (Multics) de Jouy. Coût envisagé : 6.500 F. à partager entre les 2 services de la station, pour 1 ligne et 2 pseudo-modems. Il est précisé alors que "sauf heureuse surprise, les services devront également investir à leurs frais dans les terminaux et imprimantes" (!)

Mme DAURADE effectue deux nouveaux stages :

- stage de TP sm "Goupil" organisé sur le centre
- stage "Multics" à Jouy, 4 et 5 fév. 85

Elle représente en outre le LBC à la réunion de la commission informatique du 11-4-85 à Versailles.

◊ Perspectives.

A la fin de 1985, les divers problèmes posés par l'"informatisation" du laboratoire, auxquels s'ajoutent les restrictions imposées quant au choix du matériel, paraissent l'emporter encore largement sur le bénéfice qu'il en attend. Toute décision est donc suspendue jusqu'à ce que

les données réelles de la question soient connues en totalité.

4 - Enseignement.

Le cours de Biochimie et celui de statistiques appliquées à la Biologie ont été poursuivis en 2e cycle (licence de phytoprotection) à la Faculté des Sciences d'Avignon. Le cours d'enzymologie de l'année universitaire 1985-86 a débuté dès octobre 85.

Jury de thèses (M. NIZEYIMANA)

Jurys de soutenances de mémoires de fin d'étude de licence (M. CASTEL, etc ...)

5 - Interventions publiques Radio diffusées.

14 Février : conférence sur la création de la Vie aux journées scientifiques du "Festival de l'Etrange" a Puy-St-Vincent. Retransmission sur France-Inter et émission à Radio-France-International.

5 Mars : participation au colloque organisé à Paris à l'occasion de la sortie du livre du Dr. Rupert Sheldrake "Une nouvelle science de la Vie".

20-21 Juillet : participation à l'animation de la journée "Rencontres avec d'autres Mondes" et co-animation de la journée scientifique du "Festival de l'Espace" (diffusion par France Inter).

6 - Conseil scientifique du Parc Naturel Régional du Luberon.

- Participation régulière aux travaux du conseil, en particulier aux scéances du 5 juin à la Maison du Parc à Apt, du 8 octobre, avec le GRD "patrimoine génétique animal" (projet relatif à

l'Abeille noire provençale), et du 10 décembre, à la station de Recherches Forestières d'Avignon.

7 - Expertises (Referee)

Sollicitation du Dr. Bounias pour analyses critiques des publications suivantes :

- Ouvrage de Touchstone et Sherma : Techniques and Applications of Thin Layer Chromatography (Wiley Interscience)
- Articles dans "Apidologie"
- Articles dans "Analusis"
- Articles dans "Journal of Apicultural Research"

Deuxième partie

COMPTE RENDU ADMINISTRATIF

Toute atteinte à l'autonomie
d'un être peut être
une menace pour son existence
(Vendryès, Op. Cit. p. 138)

I - BILAN BUDGETAIRE 1985

Le tableau 35 récapitule les attributions et le tableau 36 résume l'ensemble des dépenses.

Tableau 35 - Attributions budgétaires 1985

Origine du financement	Montant confirmé	Dates ou périodes d'imputation effective
Crédit INRA 1985	55.000,00	19.3.85
Reliquat 1984	4.025,60	
Côte-part INRA pour le téléphone	1.266,00	
INRA Versailles (stage de M. NIZEYIMANA)	8.580,00	15.10.85
ATP (Pins sylvestre)	26.000,00(*)	2e trim. 86
CIES (stage de Mlle Mohssine)	2.500,00(**)	courant 86

(*) 20.500 F. en équipement - (**) Accords avec la Zoologie

Total général :	97.371,60

Tableau 36 - Dépenses au titre de 1985

Catégories	Codes	Montants
Xérox CRA		6.622,80
Téléphone		3.708,86
Fourn. Entr. petit Mat.	606-3(1)	9.697,34
Prod. Chimiques	606-3(2)	12.174,78
Fourn. Administratives	606-4	6.385,85
Entr. Rép. sur Mob. et Mat.	615-54	1.721,93
Doc. Technique	618-3	37.119,30
Déplacements en France	615-11	6.876,43
Affranchissement	626	6.396,70(*)
Charges Ext. Diverses	628-28	1.566,01
Total général :		92.270,00

(*) L'attribution initiale au laboratoire n'est que de 300 F., alors que plus de 1000 pièces de correspondance sont expédiées dans l'année. Une demande de réajustement a été formulée le 10 Oct. (Réf. 85-993), sans réponse jusqu'ici. A titre indicatif, M. BOUNIAS donne 15 signatures par imputation (< 300 F) soit 30 à 45 signatures par mois pour le remboursement des frais d'affranchissement ...

II - PREVISIONS POUR 1986

Le budget de fonctionnement actuel s'avère insuffisant : les financements extérieurs (ATP) ne représentent qu'une faible part des frais de Recherche. Une attribution de 70.000 F par chercheur et ingénieur comblerait juste le décalage actuel avec la réalité concrète.

L'équipement doit être rénové et complété :

- rénové en ce qui concerne le spectrophotomètre, âgé de 20 ans et totalement dépassé en performances. Le vieil appareil ne sera conservé que pour dépannages éventuels.
- complété dans 2 domaines précis :

a) Electrophorèse : le mini équipement sur gels cylindriques est d'une portée actuellement trop limitée. En outre, l'équipement pour électrophorèse sur plaques dont disposait le laboratoire dans les années 78-80 est resté au Département de Zoologie.

Un équipement pour l'analyse sur plaques, avec gradient, transferts de gels à gels, haute tension et régulation sur tous les paramètres est devenu de première nécessité.

b) Analyse des protéines. L'équipement HPLC est plutôt destiné aux oligomolécules séparées en milieux de faible force ionique, voire apolaires. Les mêmes groupes de détection pourraient être utilisés avec des colonnes spéciales pour protéines, en chromatographie basse pression. Il conviendrait d'adjoindre au matériel existant une pompe péristaltique de haute qualité ainsi qu'un collecteur de fractions, ce qui valoriserait considérablement l'ensemble actuel.

Le tableau 37 résume l'ensemble des pièces à acquérir.

Prévisions à moyen terme.

Le fractionnement cellulaire, désormais inévitable, des échantillons à analyser, implique l'acquisition d'une ultracentrifugeuse

(≥ 200.000 g) de faible capacité. Diverses solutions de coût modéré sont envisageables :

a) soit l'achat d'un modèle de démonstration Kontron (120.000 F)

b) soit l'achat d'un modèle d'occasion (Martin Christ) à un laboratoire de l'Université (à débattre)

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE -INRA - AVIGNON

Tableau 37

EQUIPEMENTS D'URGENCE 1986

RECAPITULATIF

1 SPECTROPHOTOMETRE				
(190-900 mn) avec enregistreur et support thermostalable de cuve	Mod.	Réf: 810	KONTRON	79956,56
2 ELECTROPHORESE				
alimentation 10-3000v		Réf: 117.420	GILSON(1)	11200,00
cuve Protean II		Réf:7165.1803	BIORAD(2)	7900,00
espaceurs		Réf:7165.1841	BIORAD	415,00
peignes		Réf:7165.1865	BIORAD	297,00
sêcheurs de gels		Réf:7165.1962	BIORAD	5500,00
unité de transfert		Réf:2005.002	L.K.B.	8775,00
formeurs de gradients :	Mod.385 Cap. 100ml	Réf:7165.2000	BIORAD(3)	3000,00
	Mod. G.M.1.	Réf:1904.8501	PHARMACIA	3053,00
(1)Beyneix (2)Touzart&Mat (3)Utilisable en centrifugation				
		TOTAL		40140,00
3 CHROMATOGRAPHIE DES PROTEINES				
pompe péristaltique 2 têtes, 10 galets débit 0,5 à 1300 ml/h...		Réf: HP II		6300,00
tubes débit-métriques 0 0,25		Réf: 55.30010		122,00
0 0,38		Réf: 55.30011		122,00
0 0,50		Réf: 55.30012		122,00
Collecteurs de Fractions :				
	Mod. Hélirac	Réf: 22.12.010	L.K.B.	14280,00
+ synchronisateur de collecte		Réf: 22.12.200	L.K.B.	1660,00
+ cassette/101 tubes 12 mm		Réf: 22.12.100	L.K.B.	1250,00
		TOTAL		23856,00

CONCLUSION

Le laboratoire de Biochimie s'est doté de solides bases de connaissances relatives à la régulation du métabolisme de l'Abeille : l'impact international de ses travaux est attesté par les réactions extérieures telles que : demandes de tirés à part, demandes d'accueil sabbatique, d'expertises de publications étrangères, ainsi que d'élogieuses appréciations des rédacteurs en chef de revues internationales de haut niveau, dont quelques extraits sont joints ci-après en annexe. L'impact en France a été confirmé par l'attribution d'un Prix de l'Académie des Sciences.

Les recherches fondamentales sur la régulation enzymatique et hormonale du métabolisme glucido-lipidique de l'abeille vont se poursuivre de plus en plus en collaboration avec d'autres laboratoires français et étrangers, tandis que les travaux effectués au laboratoire même vont être de plus en plus focalisés sur la toxicologie biochimique.

L'attribution d'un poste d'ingénieur au 1er janvier 1986 permettra de développer un aspect non encore abordé : celui de la transmission synaptique, tandis que la programme de comparaison de l'action des classes de pesticides sur la glycémie et la lipémie exige soit le recrutement d'un ingénieur d'études 2e classe, ou d'un technicien de Recherche, soit, dans un premier temps, l'accueil de boursiers de thèse, sachant que dans ce dernier cas, certaines contraintes propres au régime universitaire sont à prendre en compte.

D'autre part, la collaboration instaurée depuis plusieurs années avec l'Université d'Avignon (Recherche et Enseignement) en biochimie végétale appliquée à la Phytoprotection, est appelée à s'élargir et à s'intensifier.

A brève échéance, il sera nécessaire d'augmenter la surface des locaux dont dispose le laboratoire : ce problème devrait pouvoir être résolu aisément (sauf obstruction délibérée peu probable car injustifiable) dans la station dont une surface assez importante reste inoccupée. Il conviendrait, en particulier de prévoir, dès à présent, l'implantation, au **voisinage immédiat** des locaux actuels, d'une salle "chaude" pour la manipulation de traceurs radio-actifs.

Le laboratoire offre, ainsi, un arsenal de possibilités de recherches axées sur la toxicologie moléculaire des Invertébrés et des Végétaux. Des voies originales telles que celle de l'analyse des relations fonctionnelles, pourraient permettre de constituer assez rapidement un large inventaire des effets non intentionnels comparés des diverses classes d'agents agrochimiques sur l'Abeille ainsi que sur d'autres invertébrés, à partir de critères extrêmement sensibles et performants. Le rayonnement de l'Unité dépend maintenant largement de ses capacités d'accueil, de chercheurs Universitaires (thésards) et de chercheurs étrangers (sabbatiques) pour lesquelles il existe des structures potentielles mais non exploitées. Quelques ouvertures judicieuses mettant fin à des années de demi-mesures et de pénuries de toutes natures ne manqueraient pas de se traduire par un rapide épanouissement profitable à la collectivité, tant agricole que scientifique...

ANNEXE

Extraits d'appréciations de "referees"

"It is a most interesting paper, and I am glad it will be in our Journal" (Prof. L.I. Gilbert, Editeur de Insect Biochemistry, à propos d'un manuscrit sur les interactions de l'insuline endogène et de la somatostatine sur la lipémie de l'abeille)

"The author presents the first comprehensive report on dynamic aspects of haemolymph lipids in worker honeybees. Since the animals are very sensitive to alterations of their living conditions and the experimental approach is extremely difficult, most entomologists dit only descriptive work (...). Here,for the first time,extensive studies (...) were undertaken using sophisticated methods of thin layer chromatography in the ultra-micro-range of detection" ... (Referee de "Hormone and Metabolic Research, à propos d'un manuscrit sur l'action d'agonistes et antagonistes adrénergiques sur la lipémie de l'abeille)